

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**DETEKCIJA VISOKO HETEROZIGOTNIH REGIJA U
GENOMU GOVEDA**

DIPLOMSKI RAD

Mario Mercvajler

Zagreb, rujan 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Genetika i oplemenjivanje domaćih životinja

**DETEKCIJA VISOKO HETEROZIGOTNIH REGIJA U
GENOMU GOVEDA**

DIPLOMSKI RAD

Mario Mercvajler

Mentor: Doc. dr.sc. Maja Ferenčaković

Zagreb, rujan 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Mario Mercvajler**, JMBAG 0178087866, rođen 21.05.1992. u Wangen im Allgau,
izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

DETEKCIJA VISOKO HETEROZIGOTNIH REGIJA U GENOMU GOVEDA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Mario Mercvajler**, JMBAG 0178087866, naslova

DETEKCIJA VISOKO HETEROZIGOTNIH REGIJA U GENOMU GOVEDA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Doc. dr. sc. Maja Ferenčaković mentor

2. Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik član

3. Prof. dr. sc. Ino Čurik član

Zahvala

Zahvaljujem se:

Doc.dr.sc. Maji Ferenčaković na nesebičnoj pomoći, savjetima i sugestijama te na strpljenju pri izradi ovoga rada.

Golden Helixu iz SAD-a na ustupljenoj licenci za programski paket SNP & Variation Suite (v8.4.0 Win64; Golden Helix, Bozeman, MT, USA www.goldenhelix.com) koji mi je uvelike pomogao.

Univ. prof. dipl. ing. dr. rer. nat. Johannu Sölkneru s “Universität für Bodenkultur” Beč, Austrija na ustupljenim genotipovima.

Članovima stručnog povjerenstva na sugestijama.

SADRŽAJ

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | Cilj istraživanja | 2 |
| 2 | PREGLED LITERATURE..... | 3 |
| 2.1 | Uzgoj u srodstvu..... | 3 |
| 2.2 | Inbriding depresija | 4 |
| 2.3 | “Runs of Homozigosity“ | 4 |
| 2.4 | Koeficijent uzgoja u srodstvu | 5 |
| 2.5 | “Heterozygosity Rich Regions” | 6 |
| 2.6 | “Copy number variations“ - CNV..... | 7 |
| 2.7 | Polimorfizam jednog nukleotida | 7 |
| 2.8 | Karakteristike Pinzgauer goveda | 9 |
| 3 | MATERIJAL I METODE..... | 11 |
| 3.1 | Kontrola kvalitete genotipova | 11 |
| 3.2 | Procjena genetskih parametara | 11 |
| 3.3 | Detekcija HRR segmenata i regija | 11 |
| 3.4 | Određivanje CNV-a..... | 12 |
| 3.5 | Validacija HRR segmenata | 12 |
| 3.6 | Detekcija gena u HRR segmentima | 12 |
| 4 | REZULTATI..... | 14 |
| 4.1 | Kontrola kvalitete genotipova i procjena genetskih parametara..... | 14 |
| 4.2 | Detekcija CNV i HRR. | 16 |
| 4.3 | Mapiranje gena | 27 |
| 5 | RASPRAVA | 33 |
| 6 | ZAKLJUČCI | 35 |
| 7 | POPIS LITERATURE | 36 |

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Mario Mercvajler**, naslova

DETEKCIJA VISOKO HETEROZIGOTNIH REGIJA U GENOMU GOVEDA

U posljednje vrijeme velik interes znanstvenika izazivaju "Runs of Homozygosity" (ROH) segmenti - kontinuirani dijelovi DNA nukleotidnog slijeda bez heterozigotnosti u diploidnom obliku. Nastaju kao posljedica uzgoja u srodstvu koji vodi do inbriding depresije, odnosno negativno utječe na "fitness" i proizvodna svojstva. Suprotno pojavi ROH-ova, u genomu se mogu naći „Heterozygosity rich regions" (HRR) regije s visokim postotkom heterozigotnosti. Na uzorku od 120 Pinzgauer bikova genotipiziranih HD SNP čipom detektirano je 147126 HRR. Prosječna pokrivenost genoma HRR-ovima iznosila je 0,99% (0,57-1,13%). Detektirana su i 92 česta HRR-a (proporcija veća od 0,25) gdje je nađen ukupno 91 gen (78 s opisanom funkcijom). Funkcije nađenih gena su važne za biološke procese i pojave bolesti te imaju utjecaj na "fitness" jedinke. Ovo istraživanje, za razliku od prijašnjih istraživanja, preciznije detektira same HRR-ove i zasigurno će bit polazna točka za buduća istraživanja u ovom području.

Ključne riječi: "Heterozygosity rich regions", "Copy number variation", SNP podaci, govedo

Summary

Of the master's thesis – student **Mario Mercvajler**, entitled

DETECTION OF HETEROZYGOSITY RICH REGIONS IN CATTLE GENOME

Recently, scientists have been greatly interested in Runs of Homozygosity (ROH) segments - continuous parts of the DNA nucleotide sequence without heterozygosity in diploid state. They arise as a result of inbreeding that leads to inbreeding depression, ie negatively affecting the "fitness" and production properties. Contrary to the appearance of ROH, regions with a high percentage of heterozygosity can also be found in the genome - Heterozygosity Rich Regions (HRR). On the sample of 120 Pinzgauer bulls genotyped with HD SNP chip 147126 HRR were detected. The HRR average genome coverage was 0.99% (0.57-1.13%). 92 common HRR (proportion greater than 0.25) were detected, where a total of 91 genes (78 with the described function) were found. The functions of the discovered genes are important for biological processes and the occurrence of the disease and have an effect on the "fitness" of the individual. This research, unlike previous ones, detects HRRs more precisely and will certainly be the starting point for future research in this area.

Keywords: „Heterozygosity rich regions“, Copy number variation, SNP data, cattle

1 UVOD

Govedarstvo, kao jedna od ključnih grana u stočarskoj proizvodnji, susreće se s mnogim izazovima, a jedan od glavnih je kontrola uzgoja u srodstvu ili inbridinga i njegovih štetnih posljedica. Inbriding ne može se u potpunosti izbjeći u govedarstvu, budući da su današnje moderne pasmine goveda stvorene korištenjem ove metode. Jednako tako, zbog visokog stupnja selekcije i upotrebom umjetnog osjemenjivanja putem kojeg jedan bik poželjnih osobina može biti otac tisućama teladi, uvijek postoji i opasnost od nekontroliranog uzgoja u srodstvu. Posljedice inbridinga predstavljaju velike ekonomske gubitke jer inbriding depresija može negativno utjecati na proizvodna svojstva, zdravlje i reprodukciju životinja.

Inbriding depresija se do sada uvijek procjenjivala putem regresije nekog svojstva na koeficijent uzgoja u srodstvu dobiven putem rodovnika (F_{PED}). Takav način imao je mnoge nedostatke koje nove metode procjene uzgoja u srodstvu nastoje izbjeći (Keller i sur., 2011.). Velik broj metoda javlja se razvojem molekularne genetike i sve većom dostupnošću genomskih podataka. Metoda koja se u posljednje vrijeme uspješno koristi za izračun koeficijenta uzgoja u srodstvu iz genomskih podataka je “Runs of Homozygosity” (ROH) metoda.

ROH su kontinuirani (neprekinuti) dijelovi DNA nukleotidnog slijeda bez heterozigotnosti u diploidnom obliku (Gibson i sur., 2006.), koji se mogu koristiti za izračun koeficijenta uzgoja u srodstvu (F_{ROH}) (McQuillan i sur., 2008.). F_{ROH} je preciznija mjera autozigotnosti genoma jedinke jer nije osjetljiv na greške i dubinu rodovnika te uzima u obzir stohastičku prirodu nasljeđivanja (Keller i sur., 2011.). Jednako tako ROH segmenti i F_{ROH} mogu se uspješno koristiti za procjenu inbriding depresije (Bjelland i sur., 2013.), otkrivanje regija koje uzrokuju depresiju (Keller i sur., 2012; Pryce i sur., 2014; Saura i sur., 2015.), ali i za otkrivanje uzročnih recesivnih mutacija (Drögemüller i sur., 2011.).

Suprotno pojavi ROH segmenata, u genomu se mogu naći “Runs of Heterozygosity” segmenti (Williams i sur., 2016.) koji se opisuju kao dijelovi DNA nukleotidnog slijeda bez homozigotnosti u diploidnom obliku. Ferencaković i sur., (2016) za razliku od Williams i sur., (2016) zbog same prirode nastanka heterozigotnih segmenata odbacuju takvu definiciju i segmente nazivaju “Heterozygosity Rich Regions” (HRR). Takve bi regije, za razliku od ROH regija, mogle sadržavati lokuse koji doprinose boljem preživljavanju, plodnosti i drugim “fitness” svojstvima (McParland i sur., 2009.;

Ferenčaković i sur., 2016). Mogućnost detektiranja gena koji doprinose boljem “fitnessu” neke populacije od interesa je i za proizvodnju i za očuvanje populacija. Pojava heterozigotnih regija u malim lokalnim populacijama mogla bi isto upućivati na prirodnu selekciju u cilju očuvanja “fitnessa” (Williams i sur., 2016.).

ROH segmenti i HRR regije se najčešće otkrivaju pomoću SNP-ova u genotipu. Tu može doći do prvih problema, jer se mogu detektirati male ROH ili HRR regije koje mogu bit posljedica lošeg genotipiziranja odnosno nedovoljno dobrog pokrivanja haplotipa od strane SNP-ova. Osim navedenog problema može doći i do niza drugih problema kao, naprimjer, pojava rijetkih alela. Algoritmi za otkrivanje ROH, a samim time i HRR regija temelje se na stupnju sličnosti haplotipova na homolognim kromosomima u diploidnoj jedinki (Howrigan i sur., 2011.). Zbog postojanja dijelova genoma koji se ponavljaju (engl. Copy Number Variatiation; CNV) i zbog velike srednje udaljenosti između markera (“*mean intermarker distances*”; IMD) može doći do pogrešnog signala od genotipa te prikaza homozigotnih segmenata kada oni to nisu (Howrigan i sur., 2011.). Takvi segmenti mogu bit okarakterizirani kao ROH segmenti od strane algoritma, što oni zapravo nisu, te su posljedica postojanja CNV ili IMD u tom dijelu genoma. Isti ovi problemi vrijede i za detekciju HRR.

1.1 Cilj istraživanja

Cilj ovoga rada je proširiti istraživanje Ferenčaković i sur., (2016.) gdje su prvi puta mapirani geni u HRR. Za razliku od prije navedenog istraživanja, nastojati će se preciznije odrediti HRR na način da se detektirane regije provjere na CNV i IMD, a tek onda provede provjera gena u regiji i njihova povezanost s “fitness” svojstvima.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Uzgoj u srodstvu

Uzgoj u srodstvu ili inbriding se odnosi na parenje roditelja koji dijele jednog ili više zajedničkih pretaka. Stoga je concept inbridinga usko povezan sa srodnosti te oboje imaju ključnu ulogu u evolucijskoj genetici (Charlesworth i Charlesworth, 1987.) i oplemenjivanju životinja (Kristensen i Sorensen, 2005.; Pirchner, 1985.). Inbriding značajno smanjuje genetsku varijabilnost unutar populacija, dovodi do promjena u efektivnoj veličini populacije, genetskom driftu, strukturi populacije. Inbriding mijenja frekvencije genotipova povećavajući homozigotnost na štetu heterozigotnosti ostavljajući frekvencije alela nepromijenjenima. Prema Curik i sur., (2014.) inbriding može dovesti do preraspodjele genetskih varijacija između i unutar populacija (Fernandez i sur., 1995.), smanjenja prosjeka populacije za svojstva usko povezanih sa “fitnessom” (Charlesworth i Willis, 2009.) i povećane učestalosti homozigotnih recesivnih alela (Burgos i Muenke, 2002; Alvarez i sur., 2009.) te smanjenja u homeostazi (Lerner, 1954.). Curik i sur., (2014.) opisuju inbriding kao dvosjekli mač, koji zajedno s genetskim driftom i snagom selekcije, može dovesti do poboljšanja ili deformacije jedinki ili cijele populacije.

Negativne posljedice inbridinga primijećene su vrlo rano u ljudskoj povijesti, pa tako gotovo sve kulture brane i strogo osuđuju incest, budući da se kod potomaka iz takvih zajednica javlja puno veća vjerojatnost za pojavu raznih defekata i abnormalnosti. Unatoč tome, inbriding se često koristi u uzgoju bilja i životinja. Uz selekciju i križanja, uzgoj u srodstvu je treći najčešći način kojim se povećava produktivnost i profit te se kao takav koristi stoljećima za stvaranje novih pasmina, linija unutar pasmina i brzo ustaljivanje željenih osobina. Nasuprot koristima od uzgoja u srodstvu kojima se brzo ustaljuju poželjna svojstva, postoji i negativna strana. Obzirom da inbriding povećava proporciju homozigota, time povećava i proporciju štetnih recesivnih homozigota. Većina recesivnih alela u populaciji je vrlo rijetka i malo je vjerojatno da su dvije nesrodne jedinke heterozigotni nositelji za određeni lokus. S druge strane, bliski rođaci posjeduju velik dio gena koji potječu od zajedničkog pretka (identični su po porijeklu, engl. Identical by descent – IBD) pa je veća vjerojatnost da su rijetki štetni aleli prisutni kod oba roditelja. U tom slučaju sparivanje jedinki u srodstvu dovodi do smanjenog biološkog “fitnessa” te smanjene viabilnosti u određenoj populaciji, odnosno do inbriding depresije.

2.2 Inbriding depresija

Štetna posljedica uzgoja u srodstvu naziva se inbriding depresija. Inbriding depresija može uzrokovati vrlo vidljive poremećaje poput letalnih fenotipova, vidljivih abnormalnosti i bolesti, no većinom su u pitanju ne tako očita stanja. Pritom se misli na smanjenje prosjeka raznih kvantitativnih svojstava, na usporavanje rasta i razvoja, produktivnosti i općenito viabilnosti jedinke s visokim inbriding koeficijentom (Charlesworth i Willis, 2009.).

Genetska osnova inbriding depresije najčešće je objašnjena pomoću dvije glavne hipoteze. Prva je dominantna hipoteza (Davenport, 1908.; Bruce, 1910.; Keeble i Pellew, 1910.; Jones, 1917.), koja objašnjava da je inbriding depresija uzrokovana ekspresijom štetnih recesivnih alela kod homozigotnih jedinki. Budući da inbriding povećava učestalost homozigota, recesivni štetni aleli koji su skriveni kod heterozigota, će se postupno više isticati. Druga hipoteza je overdominantna hipoteza (Davenport, 1908.; Bruce, 1910.), gdje su heterozigoti superiorniji od oba homozigota te je smanjena frekvencija heterozigota uslijed inbridinga koja dovodi do smanjenja mogućnosti izražavanja overdominantnosti (Charlesworth i Charlesworth, 1987. i 1999.). Kao primjer navode se heterozigotne jedinke koje će imati veći "fitness" u usporedbi s oba homozigota zbog bolje sposobnosti da se prilagode okolišnim uvjetima. Obje hipoteze imaju slične temeljne mehanizme koje uključuju odstupanja od prosjeka homozigota. Naime, dominantnost zahtijeva da heterozigoti budu superiorniji od prosjeka homozigota, dok overdominantnost zahtijeva da heterozigoti budu superiorniji od oba homozigota.

Inbriding depresija se većinom procjenjuje putem regresije nekog svojstva na koeficijent uzgoja u srodstvu dobiven putem rodovnika. Takav način imao je mnoge nedostatke koje nove metode procjene uzgoja u srodstvu nastoje izbjeći (Keller i sur., 2011.). Velik broj metoda javlja se razvojem molekularne genetike i sve većom dostupnošću genomskih podataka. Metoda koja se u posljednje vrijeme uspješno koristi za izračun koeficijenta uzgoja u srodstvu iz genomskih podataka je "Runs of Homozygosity" (ROHom) metoda.

2.3 "Runs of Homozygosity"

Jedinka je homozigotna za određeni marker ukoliko su oba alela na tom markeru identična. U genomu jedinke mogu se naći homozigotne regije u kojima ne opažamo

heterozigotnost, stoga sve genetske varijacije unutar takvih regija posjeduju dva identična alela. Broman i Weber (1999.) su prvi prepoznali duge homozigotne segmente u ljudskom genomu, te ih nazvali „Runs of homozygosity“ (ROH), a njihovu pojavu povezali autozigoznošću. Postojanje ROH segmenata objasnili su prijenosom istog kromosomskog segmenta s roditelja na potomka koji su ga pak naslijedili od zajedničkog pretka. Rekombinacije i drugi procesi mogu prekinuti kromosomske segmente kroz generacije. Budući da rekombinacije s vremenom prekidaju duge kromosomske segmente, dužina homozigotnih segmenata djelomično ovisi o vremenu od posljednjeg zajedničkog pretka roditelja. Stoga je broj segregacija do zajedničkog pretka niži za duge segmente u usporedbi s kratkim homozigotnim segmentima. Gibson i sur., (2006.) definiraju ROH segmente kao kontinuirane (neprekinute) dijelove DNK nukleotidnog slijeda bez heterozigotnosti u diploidnom obliku. Njihovu pojavu u genomu objašnjavaju također kao posljedicu uzgoja u srodstvu no napominju i druge mogućnosti kao što su „linkage disequilibrium“, uniparentalne disomije (posebne vrste mutacija koje karakterizira prisutnost homolognih kromosoma istog roditeljskog podrijetla u diploidnom kariotipu), heterozigotne delecije (gubitak dijela homolognog kromosoma) i selekcija. Ipak, svi nabrojani mehanizmi nastajanja homozigotnih segmenata (osim disomije), ne mogu proizvesti duge ROH segmente. Njih može proizvesti samo inbriding (Broman i Weber, 1999.; Gibson i sur., 2006.).

2.4 Koeficijent uzgoja u srodstvu

Stupanj uzgoja u srodstvu se mjeri pomoću koeficijenta inbridinga (F). Koeficijent inbridinga predstavlja kvantitativnu mjeru inbridinga odnosno vjerojatnost da su 2 homologna gena u jednoj jedinki identični po porijeklu tj. da su autozigotni (Malecot, 1948.).

Koeficijent inbridinga većinom se izračunava preko rodovnika (F_{PED}). Takav pristup ima mnoge nedostatke. On ne uspijeva „uhvatiti“ srodnosti između osnivača populacije već ih drži za nesrodne što ne mora biti istina. Također, F_{PED} predstavlja očekivani udio genoma koji je IBD te ne uzima u obzir stohastičku prirodu rekombinacije.

Budući da su ROH izravni proizvod inbridiga oni se mogu koristiti i za procjenu koeficijenta inbridinga. McQuillan i sur., (2008.) prvi definiraju novi genomski koeficijent inbridinga (F_{ROH}) i definiraju ga kao proporciju autosomalnog genoma koji je pokriven ROH segmentima u ukupnom autosomalnom genomu pokrivenom SNP-ovima. F_{ROH} potom istražuju Keller i sur., (2011.) i zaključuju kako je superiorniji od

drugih mjera inbridinga što uključuje i one dobivene iz rodovnika. F_{ROH} je mjera osjetljiva na daleki inbriding te omogućuje izravnu kvantifikaciju autozigotnosti. Uzima u obzir stohastičku prirodu nasljeđivanja na individualnoj razini, može se koristiti ukoliko nisu dostupni podaci iz rodovnika te omogućuje razdvajanje inbridinga na kromosomskoj razini. F_{ROH} pokazuje bolju preciznost u procjeni razine inbridinga, inbriding depresije, a time i bolje praćenje i mogućnost očuvanja populacije.

Osim za kvantificiranje inbridinga ROHom segmenti imaju i druge primjene. Mogu se koristiti za uspješnu procjenu inbriding depresije (Bjelland i sur., 2013.), otkrivanje regija koje uzrokuju depresiju (Keller i sur., 2012; Pryce i sur., 2014; Saura i sur., 2015.), ali i za otkrivanje uzročnih recesivnih mutacija (Drögemülleri sur., 2011.).

2.5 “Heterozygosity Rich Regions”

Suprotno pojavi ROH segmenata, u genomu se mogu naći “Runs of Heterozygosity” segmenti koji se opisuju kao dijelovi DNA nukleotidnog slijeda bez homozigotnosti u diploidnom obliku. Izraz “Runs of Heterozygosity” prvi koriste Williams i sur., (2016.). Ova grupa autora analizirala je heterozigotnost u Chillingham govedu, kao pasmini koja je u prijašnjim istraživanjima preko mikrosatelita pokazala izuzetnu homozigotnost. Koristeći genotipove dobivene putem seta polimorfizama jednog nukleotida, (engl. Single nucleotide polymorphism chip – SNP chip) potvrdili su nedostatak varijabilnosti ove pasmine. Iako su ROH segmenti činili 95% genoma, nađene su i regije koje su strogo heterozigotne. Autori smatraju kako bi te regije mogle sadržavati lokuse koji doprinose “fitnessu” i kao takve su važne za daljnje proučavanje. Ferenčaković i sur. (2016) odbacuju naziv “Runs of Heterozygosity” te uvode novi naziv za visoko heterozigotne regije te ih nazivaju „Heterozygosity rich regions“ odnosno skraćeno HRR. Također isti autori definiraju HRR-ove kao regije s visokim postotkom heterozigotnosti te su iste zastupljene u malom postotku unutar pasmine. Istraživanje su provodili na pasmini Pinzgauer, gdje su detektirali HRR te kasnije mapirali gene u tim regijama

Odnos između genetske raznolikosti i “fitnessa” predstavlja jedno od važnih pitanja u različitim područjima evolucijske biologije. Važnost razumijevanja odnosa genetske raznolikosti i “fitnessa” je važno za procjenu evolucijskog potencijala populacije te za istovremeno predviđanje smanjenja njihove genetske varijabilnosti.

Korelacija heterozigotnosti i “fitnessa” se koristi u proučavanju njihovog odnosa na individualnoj razini kod različitih organizama (Coltman i Slate, 2003.). Većina studija

koja su se bavila proučavanjem korelacije heterozigotnosti i "fitnessa" došli su do zaključka da postoji linearna, pozitivna veza između mjera individualne heterozigotnosti i svojstava povezana "fitnessom".

2.6 "Copy number variations" - CNV

CNV-ovi se koriste kao genetski markeri ili kandidat geni u genetskom mapiranju (Wang i sur.,2008.). CNV definiramo kao kromosonski segment duljine od najmanje 1kb čije kopije variraju u usporedbi s referentnim genom (Feuk i sur.,2006.). Vjerojatno je da će značajan dio CNV-ova imati funkcionalne posljedice zbog djela aleleracije ili preklapanja gena, poremećaja gena, posljedice samog položaja ili štetnosti samog gena (Beckmann i sur.,2007, Estivill i Armengol,2007.).

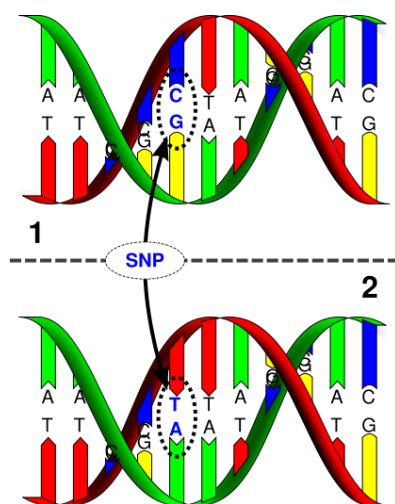
Razvijeno je više tehnologija u svrhu otkrivanja delecija ili preklapanja u genomu sisavaca (Carter,2007.). Većina metoda ovisi o analiziranju uzoraka koje ovise o intenzitetu signala koje se pojavljuje kroz genom. CNV-ovi se tradicionalno detektiraju pomoću "Comparative genomic hybridization" (CGH) tehnologije (Sebat i sur.,2004, Iafrate i sur., 2004., Locke i sur, 2006., Redon i sur., 2006.). Druge platforme mogu koristiti oligonukleotidna polja za otkrivanje CNV-ova. Budući da ove tehnologije ne ovise o SNP-ovima, tehnologije mogu pokriti cijeli genom i ustvrditi veću preciznost granice CNV-ova (Wang i sur., 2006.).

Zbog sve većeg interesa u istraživanju cijelog genoma kod sisavaca, počeli su se sve više koristiti SNP-ovi u svrhu otkrivanja i analiziranja CNV-ova. Tehnologije mjere intenzitet signala svim alelima dobivenim od SNP-a i analiziraju signale od svih SNP-ova u genomu da bi dobili podatke o CNV-ovima (Peiffer i sur., 2006., Komura i sur., 2006.). U novije vrijeme, kako bi se povećala pokrivenost SNP markera u otkrivanju CNV-ova, proizvođači SNP markera kao što su Affymetrix i Illumina, uključili su ne polimorfne markere u SNP genotipizaciju, osobito u regijama gdje znamo da postoje CNV-ovi (Wang i sur., 2006.).

2.7 Polimorfizam jednog nukleotida

U selekciji goveda se uzgojni rad do nedavno isključivo temeljio na uporabi metoda iz kvantitativne genetike, gdje je temelj selekcijskog napretka bila isključivo varijanca fenotipskih odnosno proizvodnih obilježja. U zadnjih deset godina došlo je do snažnog razvoja genomike koja omogućuje otkrivanje gena pomoću kojih možemo vidjeti utjecaj tog gena na određena gospodarski značajna svojstva, odnosno korelaciju genotipa i

fenotipa za svojstva od interesa. U tom procesu koristimo razne genetske markere od kojih se sve više koriste polimorfizmi jednog nukleotida (eng. Single Nucleotide Polymorphism - SNP). Ti markeri označavaju promjenu samo jedne nukleotidne baze u DNK molekuli odnosno promjenu jednog od četiri nukleotida (adenin, timin, gvanin i citozin). SNP kao najpolimorfiji biljeg na genomu predstavlja najzanimljiviji pristup u genotipizaciji. Kada se na jednom mjestu u genomu ili unutar para kromosoma jedne jedinke nalaze dva različita nukleotida, tada se zapravo radi o njihovom polimorfizmu. Kao primjer navodimo dva DNK fragmenta iz različitih jedinki, AAGCCTA i AAGCTTA (Slika 1.), koji sadrže razliku u jednom nukleotidu. Vidi se razlika u dva različita alela, u prvom slučaju je citozin, a u drugom timin.



Slika 1. SNP (<http://knowgenetics.org/snps/>)

Najčešći alat za genotipizaciju putem SNP-ova je “SNP čip” putem kojeg se dobivaju na tisuće ili stotine tisuća markera raspoređenih po genomu. Kod goveda najviše se koriste Illumina BovineSNP50 Genotyping BeadChip s 54 001 SNP-ova i Illumina BovineHD Genotyping BeadChip 777 972 SNP-ova (Slika 2.).



Slika 2. Illumina BovineHD BeadChip

2.8 Karakteristike Pinzgauer goveda

Pinzgauer govedo (Slika 3.) je jedno od posljednjih autohtonih pasmina na području Alpa, koje ima veliku sposobnost prilagođavanja i otpornost na vanjske utjecaje sa čvrstoćom i sposobnošću prilagođavanja. Zahvaljujući istančanom majčinskom instinktu i dobronamjernom temperamentu sve se češće koristi u sustavu krava-tele. Pasma je kombiniranih svojstava, izvanredne kvalitete mesa, finih vlakana, sočnosti te dobre mramoriranosti mesa koja u laktaciji daje oko 6.000 kg godišnje. Pasma se drži slobodnim načinom te je 2010. godine broj goveda iznosio oko 49.100. Koeficijent inbridinga za pasminu je u razdoblju od 2010 do 2013 bio $F=0.0405$, dok je efektivna veličina populacije za baznu populaciju 79 jedinki. (Fegg, 2014.).



Slika 3. Pinzgauer govedo (<http://www.hofwirtschaft-ellgass.de/unsere-weiderinder.html>)

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Kontrola kvalitete genotipova

Ukupno je putem Illumina BovineHD GenotypingBeadChip (777972 SNP-a) genotipiziran 121 bik austrijske Pinzgauer pasmine. DNA je izolirana iz sperme dobivene tijekom redovnog uzimanja ejakulata u stanicama za umjetno osjemenjivanje. Kontrola kvalitete genotipova vršila se uz pomoć programskog paketa SAS 9.4. i putem programskog paketa PLINK v1.07. (Purcell et al., 2007). Isključeni su svi SNP-ovi koji nisu pripisani kromosomima, oni koji su pripisani spolnim kromosomima i mitohondrijskoj DNA. Korištenjem Illumina parametara kontrole ("GenTrainScore" manji ili jednak 0.4 i "GenCallScore" manji ili jednak 0.7) isključeni su SNP-ovi upitne kvalitete. Zadnji korak kontrole kvalitete isključivao je SNP-ove koji su bili prisutni u manje od 10% jedinki, te jedinke kojima je nedostajalo više od 5% SNP-ova.

3.2 Procjena genetskih parametara

Genetski parametri procijenjeni i razmatrani u radu bili su broj polimorfnih SNP-ova, broj monomorfnih SNP-ova, opažena heterozigotnost (HET_{OBS}) koja je izražena kao proporcija heterozigotnih jedinki za pojedini SNP i zatim uprosječna za pojedini kromosom ili cijeli genom te očekivana heterozigotnost (HET_{EXP}) koja je dobivena putem frekvencije alela. Uz navedeno procijenjen je koeficijent inbridinga F_{IS} koji je definiran kao $1 - (HET_{OBS}/HET_{EXP})$ i jednak je Wright-ovom (Wright, 1949) fiksacijskom indeksu čije su vrijednosti između -1 i +1. Navedeni parametri procijenjeni su putem programskog paketa PLINK v1.07 i programskog paketa SNP & Variation Suite (v8.4.0 Win64; Golden Helix, Bozeman, MT, USA www.goldenhelix.com).

3.3 Detekcija HRR segmenata i regija

HRR segmenti su detektirani uz pomoć programskog paketa SNP & Variation Suite. Kako bi se detektirao niz heterozigotnih SNP-ova prvo je pripremljen set podataka u kojem je zamijenjen status svakog SNP-a na način da su heterozigoti proglašeni homozigotima i obratno. To je učinjeno kako bi algoritam implementiran u SNP & Variation Suite, a koji detektira homozigotne segmente, na taj način detektirao heterozigotne segmente. HRR segmenti su definirani kao niz od najmanje 50 heterozigotnih SNP-ova minimalne duljine od 1000bp. Gustoća SNP-ova u takvom segmentu morala je iznositi barem jedan SNP na 50bp. Također je dozvoljeno da

segment sadrži najviše dva negenotipizirana SNP-a i četiri homozigotna SNP-a (Williams et al., 2016), ali oni nisu smjeli biti jedan za drugim (Ferenčaković et al., 2013). HRR regija definirana je kao mjesto na genomu gdje se HRR segment nalazi u više od 25% jedinki.

3.4 Određivanje CNV-a

Vrijednosti Log R ratio (LRR) parametra izdvojeni su iz Illumina BovineHD finalreport dokumenta dobivenog kao rezultat genotipizacije i potom pripremljeni za analizu uz pomoć programskog paketa SNP & Variation Suite. Korištenjem algoritma “*multivariate copy number analysis method*” (CNAM) algoritma navedenog programskog paketa i korekcijom (“wave detection” wave factor valuet hreshold = 0.05) nad autosomalnim kromosomima putem referentnog goveđeg genoma UMD3.1 ukupno je za analizu preostalo 89 jedinki. Maksimalni broj segmenata dozvoljen na 10 000 SNP-ova bio je 20, a minimalni broj SNP-ova po segmentu je bio tri. Maksimalna vrijednost uparenih segmenata bila je 0.005 (2000 permutacija po paru). CNV segmentima je onda prema radu Zhou i sur. (2016) dodijeljen status “-1” za gubitak “0” za neutralni i “+1” za dobitak segmenta.

3.5 Validacija HRR segmenata

Kako bi se utvrdilo da li je određeni HRR segment zaista regija s visokom heterozigotnošću procijenjeni su određeni parametri. Procijenjena je proporcija heterozigotnih jedinki za svaki marker, proporcija jedinki s CNV-om za svaki marker u odnosu na CNV status (dobitak, gubitak ili oboje), te srednja udaljenost između markera (engl: mean intermarker distances; IMD) čija je gornja granica za detekciju “outlier” vrijednosti postavljena na 9.24kb.

HRR regije koje se poklapaju sa CNV regijama i IMD im je veći od 9.24kb smatraju se prividnim regijama te ne predstavljaju prava područja povećane heterozigotnosti. Analiza i vizualizacija dobivenih parametara učinjena je vlastitom ustupljenom R skriptom autora Yuriya Taniya Utsunomiya i Wilsona Nandolo koju sam prilagodio HRR-ovima.

3.6 Detekcija gena u HRR segmentima

Segmenti koji su se pojavljivali u više od 25% jedinki i koji nisu bili prividne već prave regije analizirani su na gene prisutne u njima ili njihovoj blizini (± 1 Mb). Geni su

detektirani programskim paketom SNP & Variation Suite, a njihova funkcija je pretražena putem online baza podataka <http://www.uniprot.org> i <http://www.genecards.org> (posljednji pristup 25.09.2017). Genom je mapiran koristeći genetsku mapu UMD 3.1.1. (<http://bovinegenome.org/?q=node/61>).

4 REZULTATI

4.1 Kontrola kvalitete genotipova i procjena genetskih parametara

Nakon kontrole kvalitete genotipova, set podataka sastojao se od 611102 SNP-ova na autosomalnim kromosomima ukupne duljine od 2507812473 bp i 120 jedinki.

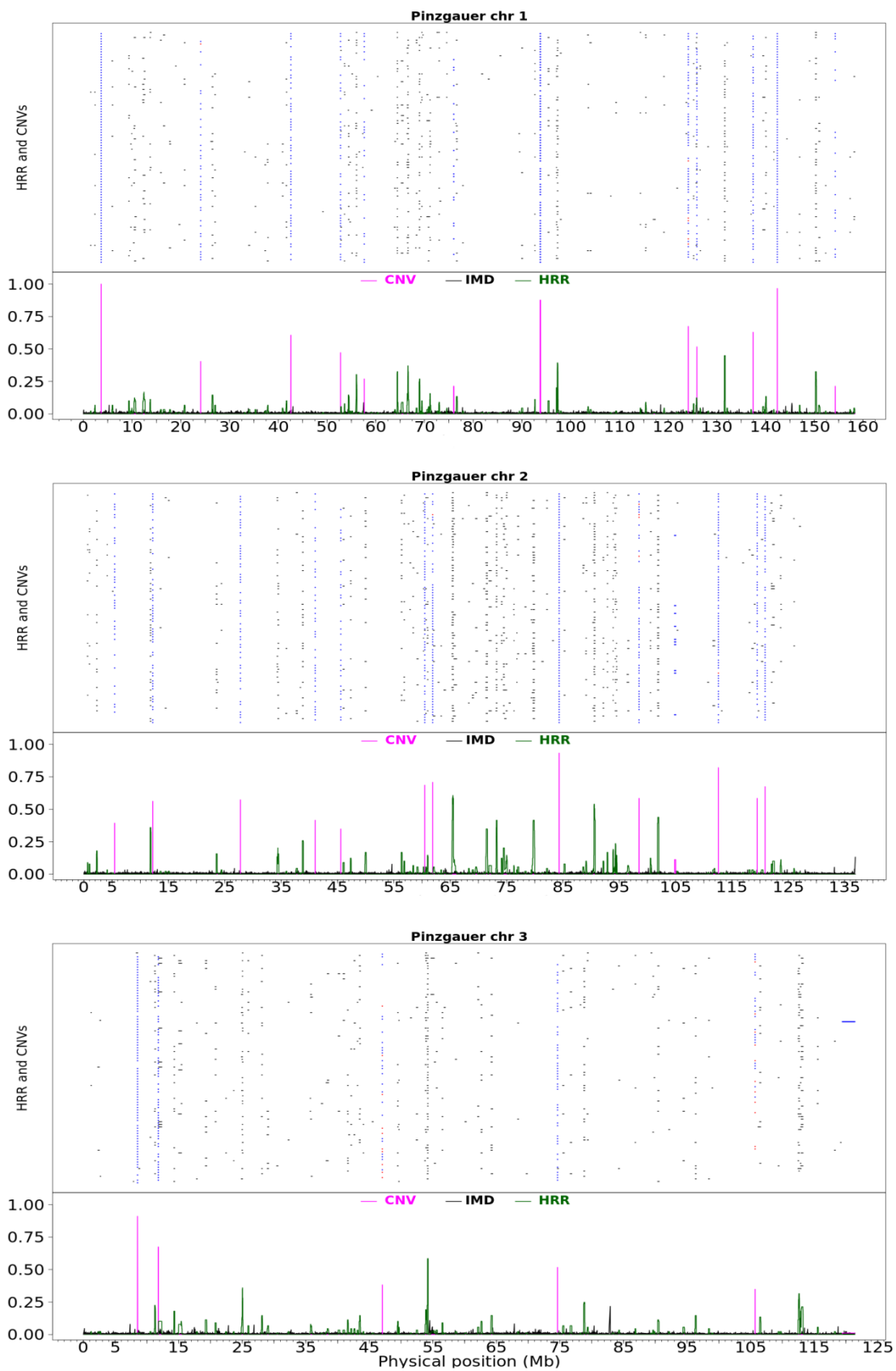
Procijenjeni ukupni genetski parametri za ovu populaciju iznosili su: broj polimorfnih SNP-ova; 603076 (98,7%), broj monomorfnih SNP-ova; 8026 (1,3%), prosječna opažena heterozigotnost (HET_{OBS}); 0,346 (0,320 – 0,363), očekivana heterozigotnost (HET_{EXP}); 0,341 (0,329 - 0,342). Procijenjeni koeficijent inbridinga F_{IS} iznosio je -0,0133 (-0,0638 – 0,0644). Također je pobrojen broj monomorfnih i polimorfnih SNP-ova i procijenjena je HET_{OBS} za svaki kromosom, što je prikazano u Tablici 1. Najveća vrijednost HET_{OBS} bila je prisutna na kromosomu 27 (0,365), a najniža na kromosomu 2 (0,316).

Tablica 1. Genetski parametri populacije Pinzgauer goveda za svaki autosomalni kromosom

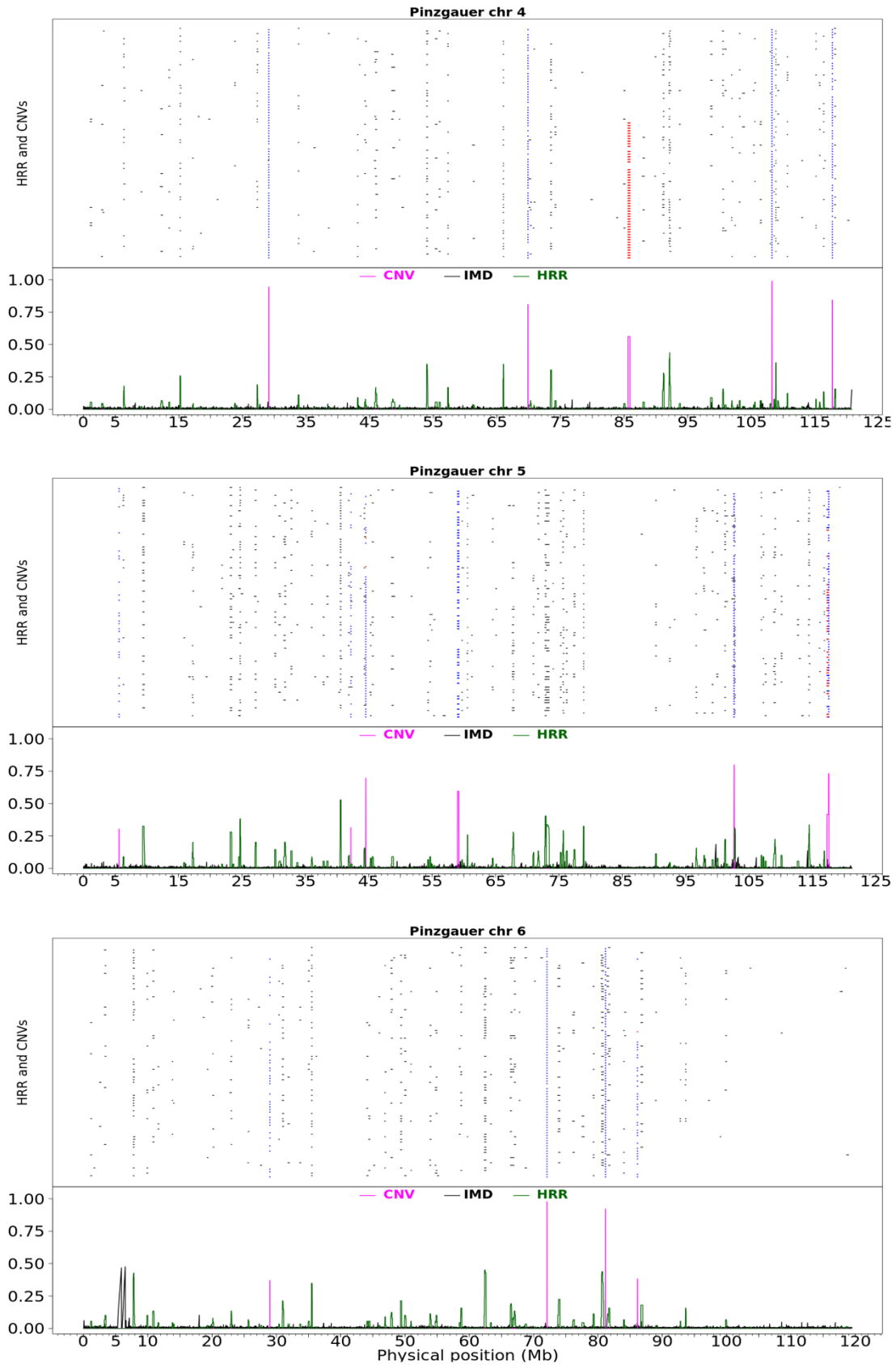
| Kromosom | Ukupno SNP-ova | Broj polimorfnih SNP-ova | Broj monomorfnih SNP- ova | Opažena heterozigotnost |
|----------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| 1 | 38842 | 38321 | 521 | 0,340 |
| 2 | 33150 | 32673 | 477 | 0,316 |
| 3 | 29606 | 29266 | 340 | 0,349 |
| 4 | 29315 | 28947 | 368 | 0,347 |
| 5 | 28766 | 28399 | 367 | 0,347 |
| 6 | 30149 | 29771 | 378 | 0,332 |
| 7 | 27150 | 26812 | 338 | 0,349 |
| 8 | 24650 | 23898 | 752 | 0,329 |
| 9 | 25761 | 25536 | 225 | 0,354 |
| 10 | 26063 | 25815 | 248 | 0,352 |
| 11 | 27422 | 27105 | 317 | 0,341 |
| 12 | 21828 | 21570 | 258 | 0,352 |
| 13 | 17728 | 17310 | 418 | 0,338 |
| 14 | 18703 | 18340 | 363 | 0,325 |
| 15 | 20695 | 20453 | 242 | 0,349 |
| 16 | 20061 | 19779 | 282 | 0,345 |
| 17 | 19036 | 18791 | 245 | 0,351 |
| 18 | 16460 | 16278 | 182 | 0,356 |
| 19 | 16066 | 15873 | 193 | 0,359 |
| 20 | 18723 | 18487 | 236 | 0,353 |
| 21 | 17484 | 17303 | 181 | 0,343 |
| 22 | 15568 | 15458 | 110 | 0,354 |
| 23 | 12997 | 12862 | 135 | 0,354 |
| 24 | 15483 | 15272 | 211 | 0,356 |
| 25 | 10976 | 10878 | 98 | 0,349 |
| 26 | 13272 | 13147 | 125 | 0,362 |
| 27 | 11425 | 11319 | 106 | 0,365 |
| 28 | 11211 | 11099 | 112 | 0,358 |
| 29 | 12512 | 12314 | 198 | 0,344 |

4.2 Detekcija CNV i HRR.

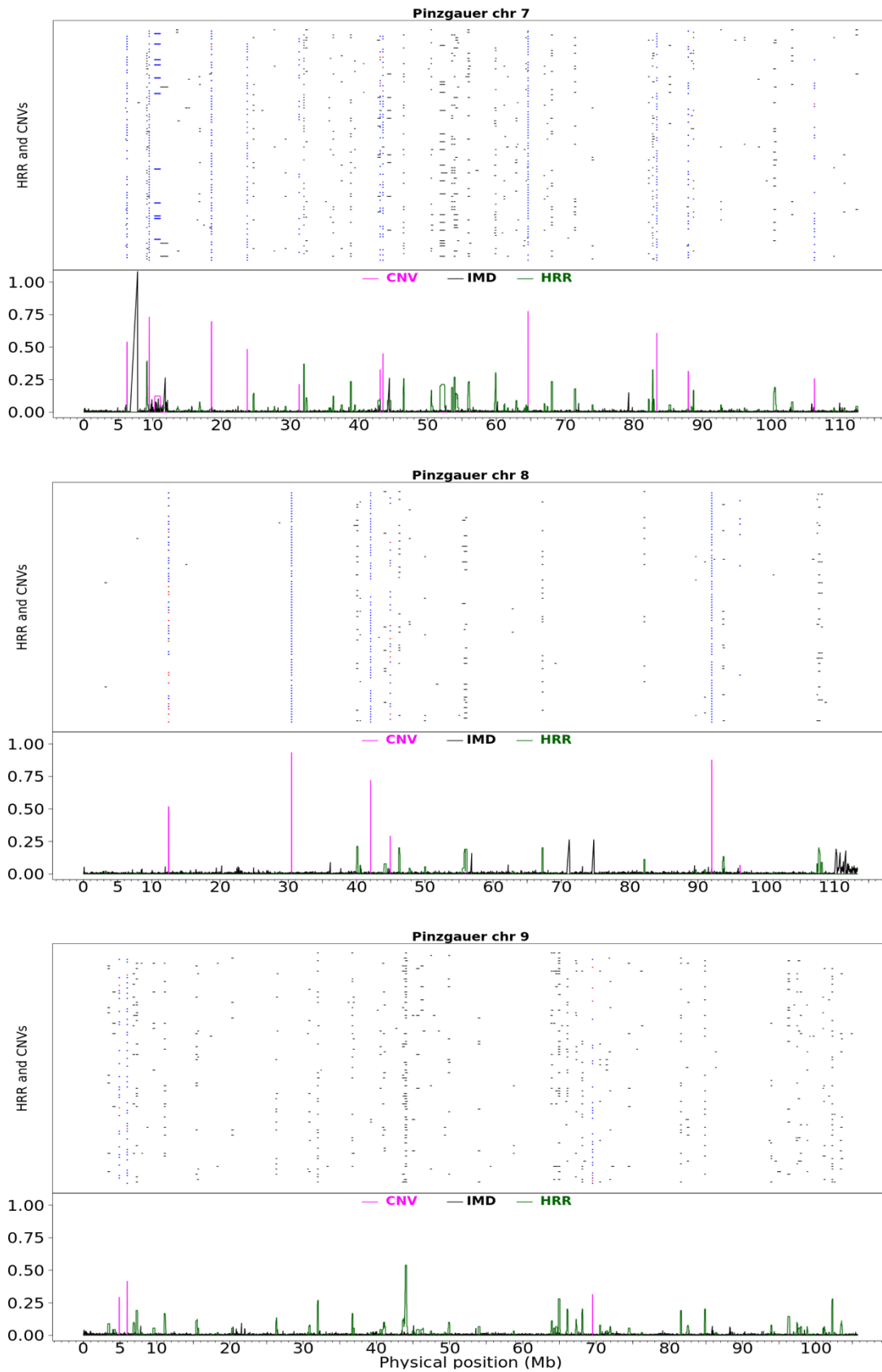
U genomu Pinzgauer goveda detektirano je ukupno 14126 HRR segmenata. Najveći segment, po duljini koju pokriva na genomu, iznosio je 1386964bp i nalazio se na kromosomu 21, a najkraći je iznosio 58072 bp i nalazio se na kromosomu 10. Kod detekcije CNV-ova nađeno je ukupno 184 regije. Najviše regija pronađeno je na kromosomu broj 2 i ukupno ih je 13, dok ih je najmanje pronađeno na kromosomu broj 16 gdje se nalazi samo jedna CNV regija. Najduža CNV regija nalazi se na kromosomu broj 11 i iznosi 4536065 bp, dok je najmanja regija na kromosmu broj 20 koja iznosi 1169 bp. U niže prikazanim slikama vidljive su sve nađene regije po kromosomu (Slika 4).



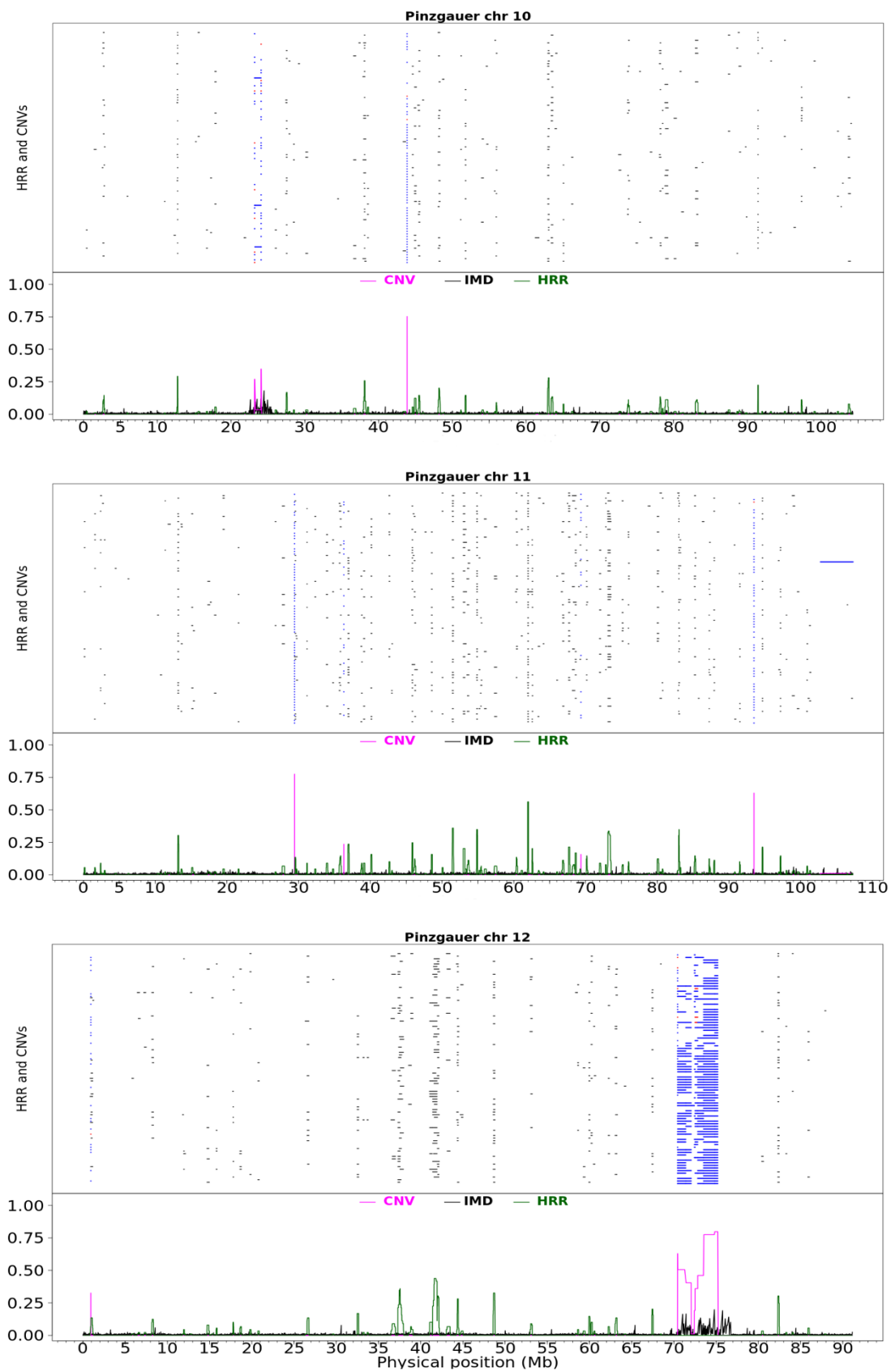
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu.



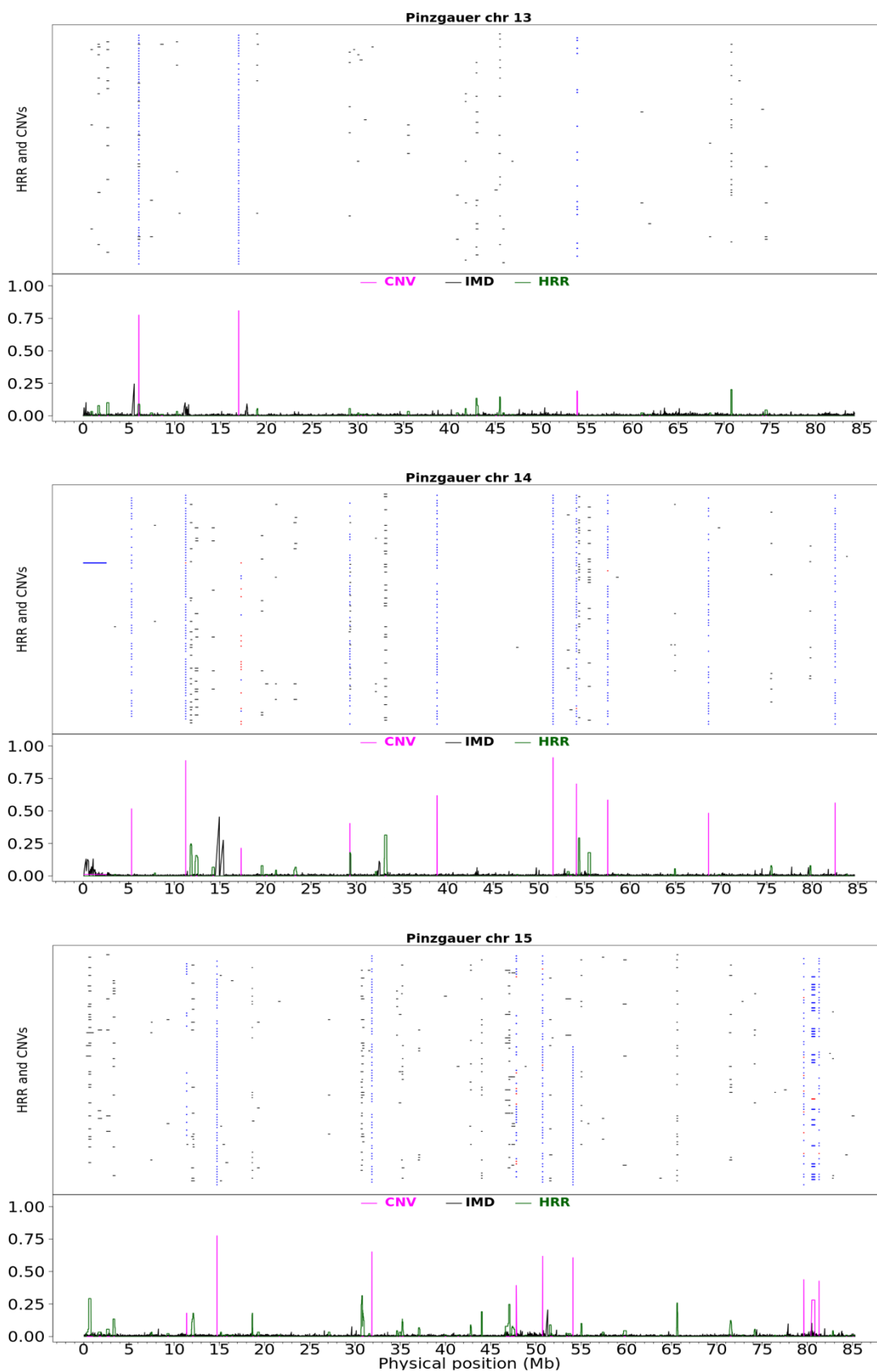
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu - NASTAVAK



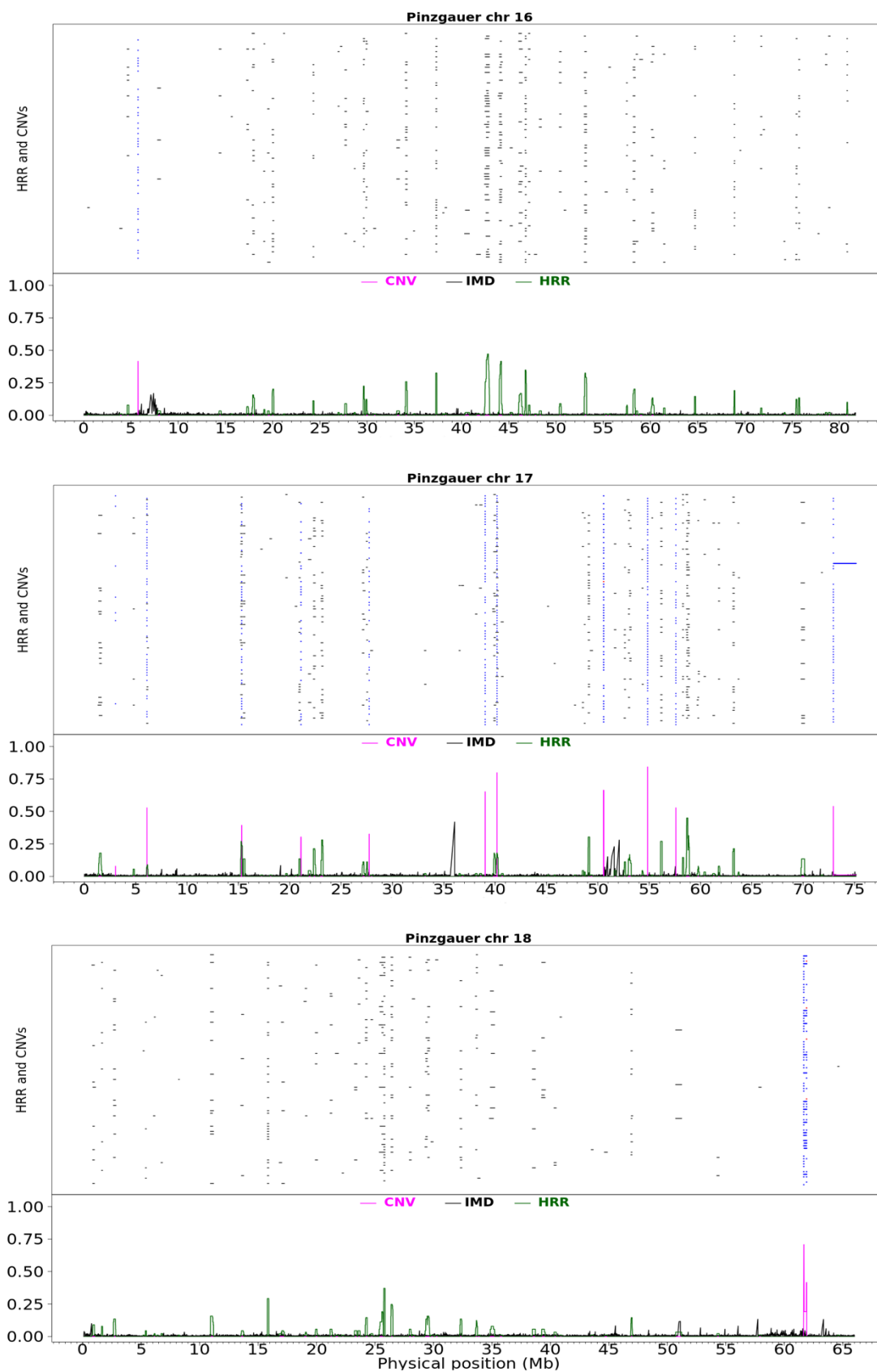
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu-
NASTAVAK



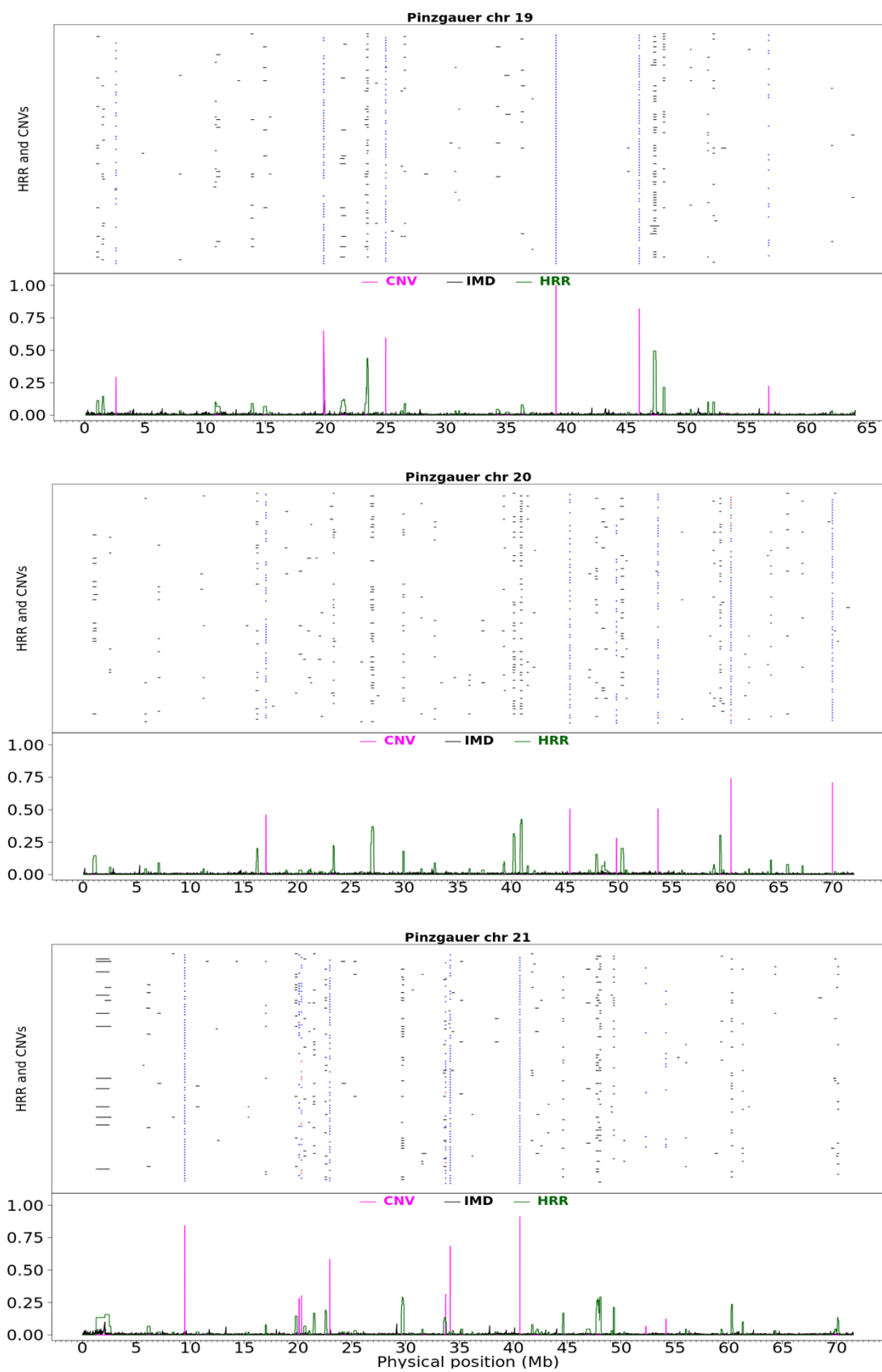
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu -
NASTAVAK



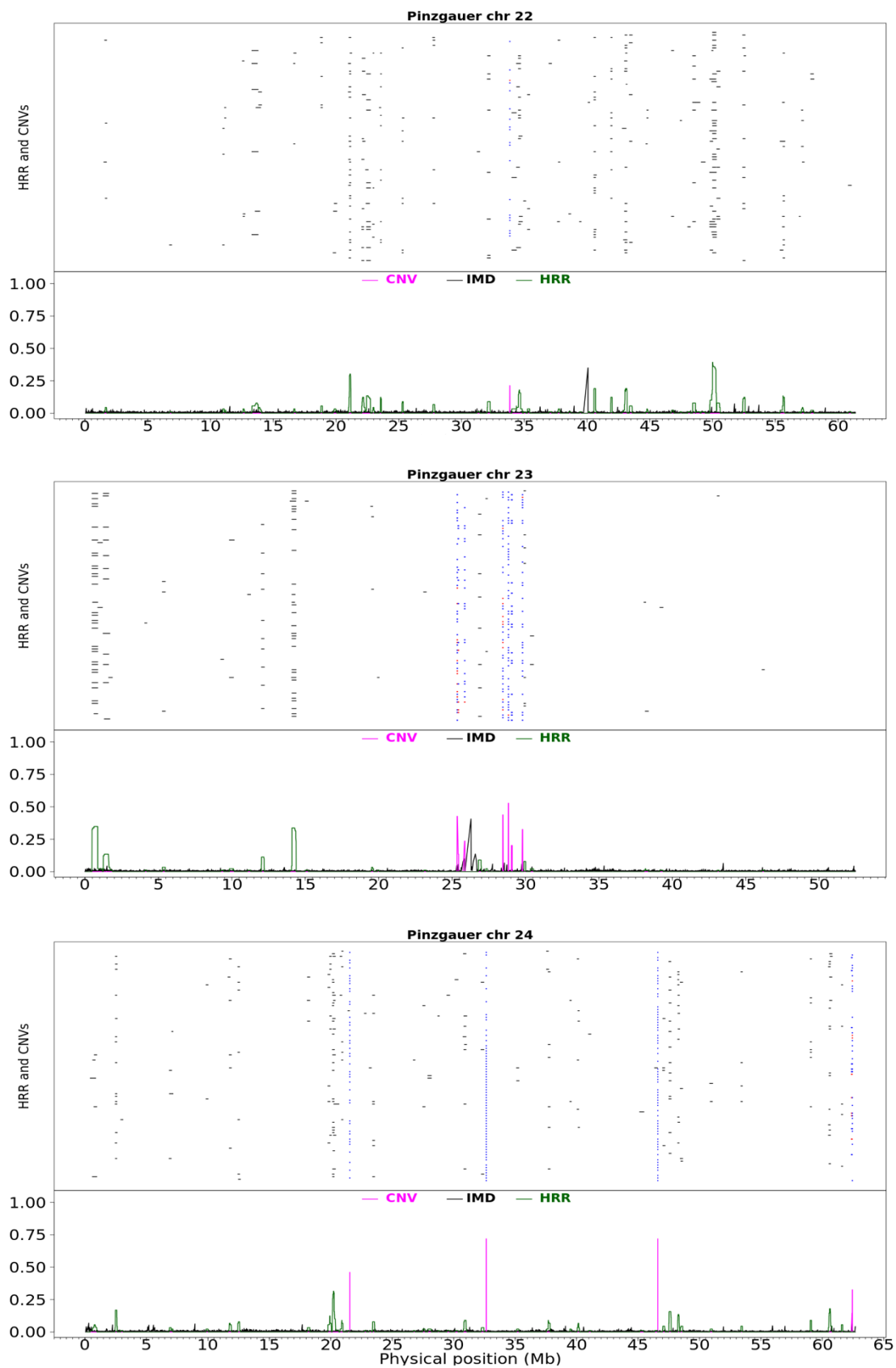
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu - NASTAVAK



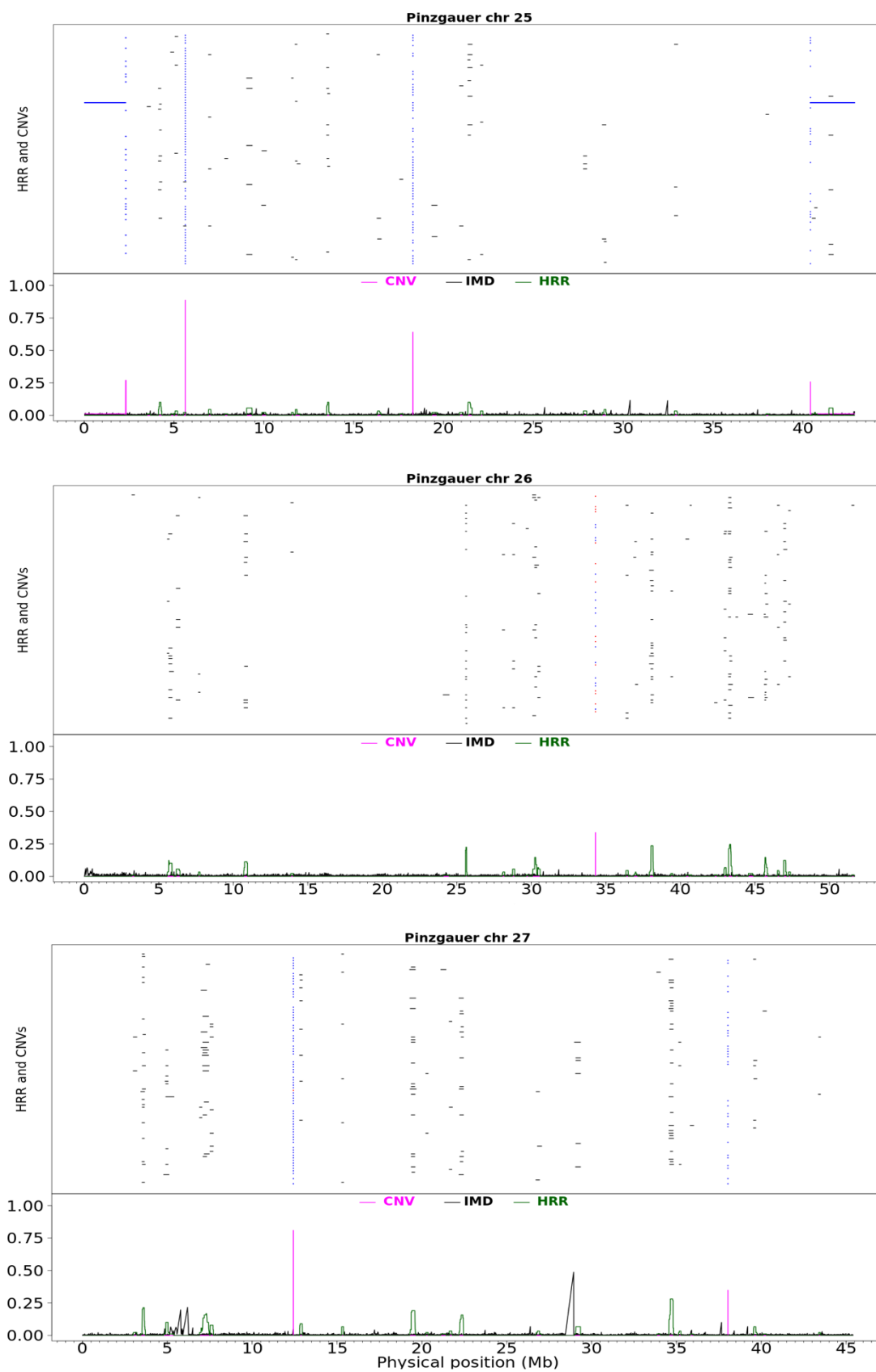
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu - NASTAVAK



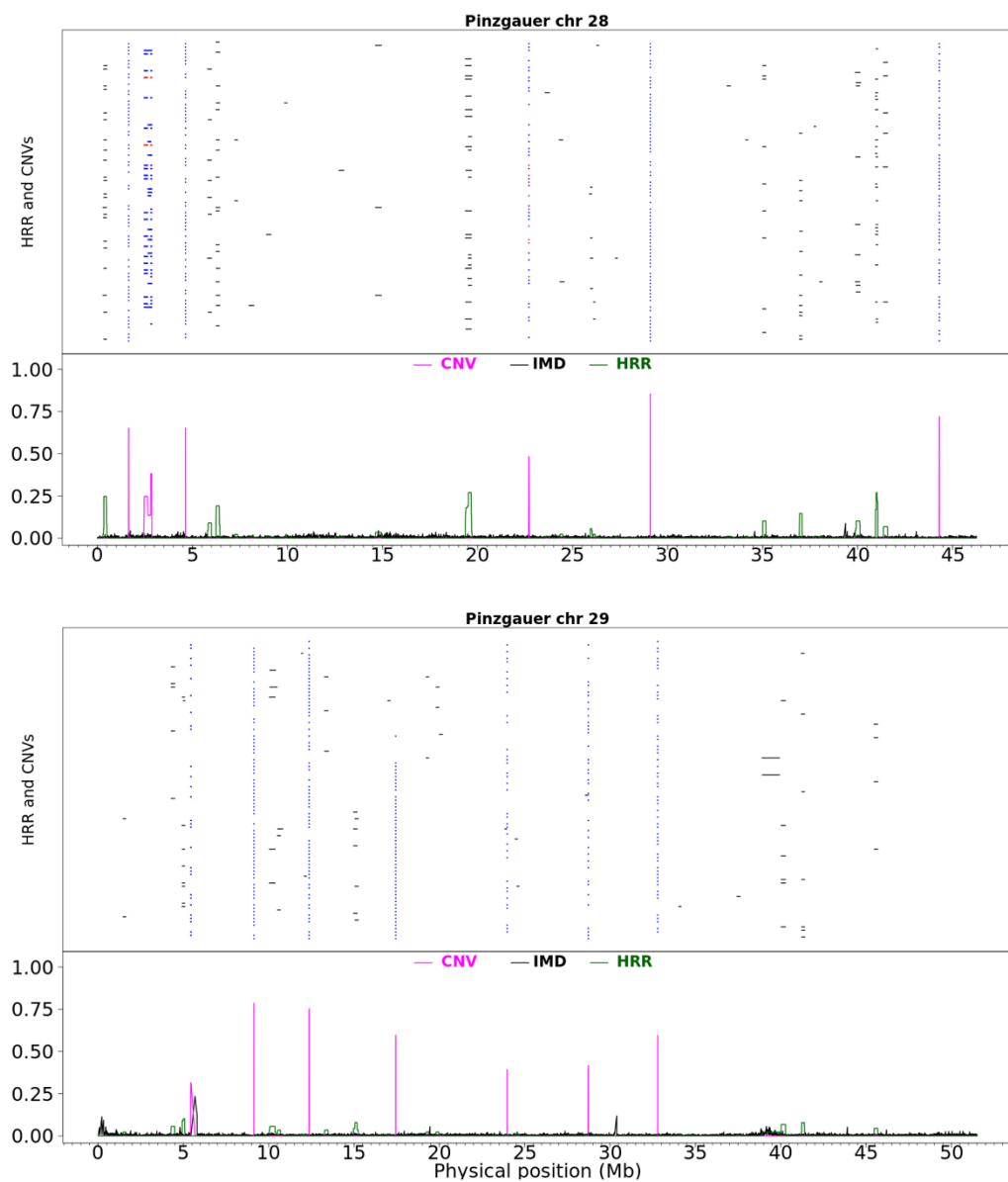
Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu - NASTAVAK



Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu -
NASTAVAK



Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu -
NASTAVAK



Slika 4. Položaj HRR (zeleno), CNV(magenta) i IMD (crno) na svakom kromosomu-NASTAVAK

4.3 Mapiranje gena

Obzirom da smo odredili kako se HRR-ovi moraju nalaziti u najmanje 25 % jedinki te se moraju odvojiti od prividnih regija, odnosno CNV regije i tamo gdje je IMD veći od 9.24kb, dobili smo 92 HRR-ova na 25 kromosoma. U Tablici 2. prikazane su točne pozicije regija na kromosomima te geni i njihove funkcije preuzete iz online baza podataka. Na kromosomima broj 18, 19, 24, 26 i 27 nalazila se samo jedna regija, na kromosomima broj 14, 22, 23 i 28 nalaze se dvije regije, na kromosomima broj 6, 10, 17 i 20 nalaze se tri regije, na kromosomima broj 3, 9, 12 i 15 nalaze se četiri regije, na kromosomu broj 4 nalazi se pet regija, na kromosomima broj 7, 11 i 16 nalaze se šest regija, na kromosomu broj 1 nalazi se šest regija, na kromosomu broj 2 nalazi se osam regija, dok se na kromosomu broj 5 nalazi najveći broj regija, odnosno 11 regija. U prethodno navedene 92 regije ukupno je pronađen 91 gen te 26 regija u kojima nije bio pronađen niti jedan gen. Od 91-og zabilježenog gena, njih 78 ima poznatu i opisanu funkciju, dok se za ostale za sada samo zna da su kodirajući geni.

Tablica 2. HRR prisutne u više od 25% jedinki te geni i njihove funkcije prisutni u njihovoj blizini (± 1 Mb).

| Chr | Početak regije (bp) | Kraj regije (bp) | Gen | Početak gena (bp) | Kraj gena (bp) | Uloga gena* |
|-----|---------------------|------------------|-----------|-------------------|----------------|---|
| 1 | 56000221 | 56081198 | nema gena | | | |
| | 64387526 | 64483139 | IGSF11 | 64357122 | 64488105 | Regulira rast |
| | 66581806 | 66682945 | POLQ | 66552011 | 66659954 | Jedan od 43 gena koji kontroliraju stanični ciklus kromosomske replikacije |
| | 68909418 | 69053048 | ROPN1 | 68954525 | 68989623 | Reguliranje proteinske fosforilacije |
| | 97252608 | 97391703 | EIF5A2 | 97308271 | 97324962 | Vezanje ribosoma |
| | 131546556 | 131702250 | FAIM | 131548459 | 131564836 | Djeluje kao induksijska molekula koja sudjeluje u kontroli Fas rezistencije koju stvara površinsko djelovanje Ig-a na B stanice |
| | | | ESYT3 | 131669531 | 131722942 | Vezivanje lipida |
| | 150258078 | 150404172 | DOPEY2 | 150169936 | 150293609 | Transport golgijevog aparata |
| | | | CHAF1B | 150360988 | 150386586 | Vezanje histona |
| | 11763208 | 11899039 | nema gena | | | |
| 2 | 38765083 | 38949731 | ERMN | 38780333 | 38785787 | Važna uloga u razvoju i strukturi centralnog živčanog sustava |
| | 65318164 | 65574548 | GPR39 | 65526345 | 65527741 | Regulacija tjelesne težine, gastrointestinalne mobilnosti i hormonske sekrecije |
| | 71382630 | 71622122 | STEAP3 | 71380830 | 71424474 | Ovaj gen kodira protein dvostruke membrane koji djeluje kao transporter željeza |
| | | | DBI | 71561192 | 71566372 | Gen kodira protein koji upravlja hormonima |
| | 73164909 | 73311480 | GLI2 | 72977209 | 73168370 | Igra ulogu tijekom embriogeneze |
| | 79683737 | 79954328 | GLS | 79798261 | 79852401 | Utječe na aktivnost glutaminaze |
| | 90526660 | 90723853 | ALS2 | 90664833 | 90712586 | Gen djeluje kao faktor razmjene nukleinskog gvanina za malu GTPazu |
| | 101783863 | 102037104 | nema gena | | | |
| | 25018412 | 25054981 | nema gena | | | |
| 3 | 54166354 | 54261102 | GBP6 | 54220013 | 54261102 | Aktivacija GTPaze i vezivanje GTP |
| | 78737414 | 78905736 | WDR78 | 78736778 | 78825880 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | | | INSL5 | 78846970 | 78852272 | Uloga u aktiviranju hormona i vezivanje receptora za G-protein |
| | 112552923 | 112695981 | CSMD2 | 112558420 | 112898742 | Vezan uz pojavu shizofrenije i tumorski supresor za rak debelog crijeva |

*Funkcije gena preuzete s UniProt (<http://www.uniprot.org>) i/ili GeneCards (<http://www.genecards.org>).

Tablica 2. HRR prisutne u više od 25% jedinki te geni i njihove funkcije prisutni u njihovoj blizini (± 1 Mb).– NASTAVAK

| Chr | Početak regije (bp) | Kraj regije (bp) | Gen | Početak gena (bp) | Kraj gena (bp) | Uloga gena* |
|-----|---------------------|------------------|-------------|-------------------|----------------|---|
| 4 | 53954394 | 54097830 | FOXP2 | 54087329 | 4164075 | Povezivanje DNA |
| | | | MINDY4 | 65865704 | 65984140 | Vjerojatno regulira hidrolizu koja uklanja ubiquitin iz protein |
| | 65972562 | 66081655 | INMT | 66002072 | 66002203 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | | | CRHR2 | 66062161 | 66090181 | Regulira aktiviranje receptora povezanog s G-proteinom |
| | 73441682 | 73595915 | ZNF804B | 73326980 | 73897041 | Kodira protein |
| | 91185383 | 92201419 | bta-mir-592 | 92126804 | 92126899 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | 108829046 | 108898309 | TPK1 | 108539467 | 108922091 | Katalizira fosforilaciju tiamina u tiamin pirofosfatu |
| 5 | 9344250 | 9568720 | PPP1R12A | 9374685 | 9511533 | Regulator proteinske fosfataze |
| | | | NUDT4 | 23348068 | 23364470 | Regulira promet fosfataze |
| | 23143535 | 23405113 | UBE2N | 23370705 | 23411877 | Vezivanje RNA i ATP |
| | 24675037 | 24762252 | nema gena | | | |
| | 40514553 | 40638405 | MUC12 | 40558541 | 40597587 | Gen kodira integralni membranski glikoprotein |
| | 60558838 | 60620821 | SNRPF | 60556051 | 60564297 | Vezivanje RNA |
| | 67763575 | 67866565 | NT5DC3 | 67791379 | 67850986 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | 72842100 | 73477233 | nema gena | | | |
| | 75670953 | 75712321 | nema gena | | | |
| | 78869758 | 78949892 | DENND5B | 78850999 | 78966082 | Gen povezan s aktivnosti kalcijevih kanala |
| | 102723706 | 102834308 | F1MNY8 | 102726402 | 102729724 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | | | PACSIN2 | 114357560 | 114475163 | Aktivnost kinaze |
| | 114415026 | 114509640 | TTLL1 | 114494264 | 114530242 | Vezivanje ATP i aktivacija ligaze |
| | | | SEC24D | 7651891 | 7761965 | Kodira protein |
| 6 | 7741623 | 7879233 | METTL14 | 7797201 | 7837774 | Regulator stabilnosti i metilacija mRNA |
| | 62369529 | 62602853 | TMEM33 | 62464346 | 62478760 | Kodira protein. Strukturni sastojak nuklearnog pora |

*Funkcije gena preuzete s UniProt (<http://www.uniprot.org>) i/ili GeneCards (<http://www.genecards.org>).

Tablica 2. HRR prisutne u više od 25% jedinki i geni prisutni u njima – NASTAVAK

| Chr | Početak regije (bp) | Kraj regije (bp) | Gen | Početak gena (bp) | Kraj gena (bp) | Uloga gena* |
|-----|---------------------|------------------|-----------|-------------------|----------------|--|
| 7 | 9108203 | 9196559 | CASP14 | 9119591 | 9123207 | Gen igra središnju ulogu u fazi izvođenja apoptoze stanica |
| | | | CCDC105 | 9168858 | 9178475 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata Uključen u regulaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (VSMC) |
| | 31967906 | 32046915 | PRDM6 | 31950213 | 32058001 | kontraktilnih proteina |
| | 53848286 | 53993012 | PCDHB4 | 53908354 | 53910744 | Vezuje kalcijev ion |
| | 59856761 | 59941335 | PPP2R2B | 59782768 | 60099412 | Regulator proteinske fosfataze |
| | 67994100 | 68179832 | CNOT8 | 68039858 | 68057466 | Vezanje nukleinske kiseline i vezanje RNA |
| | | | MRPL22 | 68106044 | 68141498 | Strukturni dio ribosoma |
| | 82735110 | 82788615 | WWC1 | 82703348 | 82782761 | Utječe na pamćenje i vezivanje kinaze |
| | 31963353 | 32049723 | nema gena | | | |
| | 43914249 | 44122586 | CRYBG1 | 43886256 | 43937667 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| 9 | 64858840 | 65060198 | nema gena | | | |
| | 102266051 | 102333567 | nema gena | | | |
| 10 | 12724329 | 12779487 | MEGF11 | 12721325 | 12807326 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | 38062137 | 38158782 | F1MUY5 | 38111923 | 38135944 | Gen utječe na vezivanje kolesterola |
| | | | CDAN1 | 38138863 | 38151656 | Negativno utječe na DNA replikaciju |
| | 62982611 | 63109546 | nema gena | | | |
| 11 | 13165746 | 13280543 | ZNF638 | 13155560 | 13235444 | Povezuje sekvence bogate citidinom u dvolančanu DNA. Povezuje RNA. |
| | 51428588 | 51581473 | nema gena | | | |
| | 54827608 | 54950019 | CTNNA2 | 54723190 | 55906462 | Sudjeluje u vezivanju kadherina i aktivan u molekularnoj strukturi |
| | 61932165 | 62057011 | WDPCP | 61970467 | 61994479 | Aktivan u razvoju probavnog sustava, uspostavljanju lokalizacije proteina i razvoju dišnog susta |
| | | | GFPT1 | 67684390 | 67728959 | Sudjeluje u vezivanju ugljikohidratnog derivata |
| | 73122042 | 73470176 | EPT1 | 73134172 | 73173557 | Katalizira biosintezu fosfatidiletanolamina iz CDP-etanolamina. Samim time ima važnu ulogu u formiranju i održavanju vezikularnih membrana |
| | | | ADGRF3 | 73199746 | 73208635 | Regulira aktiviranje receptora povezanog s G-proteinom |
| | | | RAB10 | 73335436 | 73400455 | Ativacija GTPaze i vezivanje GTP |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

*Funkcije gena preuzete s UniProt (<http://www.uniprot.org>) i/ili GeneCards (<http://www.genecards.org>).

Tablica 2. HRR prisutne u više od 25% jedinki i geni prisutni u njima – NASTAVAK

| Chr | Početak regije (bp) | Kraj regije (bp) | Gen | Početak gena (bp) | Kraj gena (bp) | Uloga gena* |
|-----|---------------------|------------------|-----------|-------------------|----------------|--|
| 12 | 37454520 | 37677261 | nema gena | | | |
| | 41418270 | 42171539 | F1ME41 | 41907041 | 41907707 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | 44354593 | 44454167 | KLHL1 | 44295888 | 44616940 | Utječe na ponašanje jedinke |
| | 82300472 | 82476982 | nema gena | | | |
| 14 | 33066228 | 33304950 | MCMD2 | 33074314 | 33113841 | Utječe na spermatogenezu i na vezivanje DNA i ATP |
| | | | CSPP1 | 33243588 | 33342863 | Pozitivno utječe na citokenzu |
| | 54349231 | 54477039 | CSMD3 | 53901591 | 54429251 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| 15 | 547375 | 787417 | OR9G1 | 577327 | 578564 | Regulira aktiviranje receptora povezanog s G-proteinom |
| | 30681395 | 30815282 | PVRL1 | 30743667 | 30758246 | Vezanje molekule stanične adhezije i aktiviranje receptora |
| | | | RM17 | 47004019 | 47005492 | Strukturni sastojak ribosoma |
| | 46991080 | 47132412 | DCHS1 | 47042652 | 47064122 | Vezanje kalcijevog iona |
| | | | RRP8 | 47082236 | 47085798 | Vezanje metiliranog histona i vezanje RNA |
| | | | DNHD1 | 47108929 | 47171016 | Kodira protein i sudjeluje u aktivnosti mikrotubula |
| | 65579912 | 65642976 | ABTB2 | 65548291 | 65735623 | Sudjeluje u aktivnosti heterodimerizacije proteina |
| 16 | 29610459 | 29696935 | TMEM63A | 29624572 | 29655286 | Vezanje nukleinske kiseline |
| | | | LEFTY2 | 29663583 | 29666431 | Regulacija apoptatskog procesa i aktivan faktor rasta |
| | 37272286 | 37390354 | nema gena | | | |
| | 42507253 | 42926478 | PLOD1 | 42595152 | 42625615 | Membranski homodimerni protein lokaliziran u cisternama endoplazmatskog retikuluma |
| | | | NPPB | 42700409 | 42701796 | Regulira veličinu krvnih žila i aktivira hormone |
| | 44002361 | 44228052 | DFFA | 43994268 | 44004665 | Negativno utječe na završnu fazu apoptaze |
| | | | KIF1B | 44080103 | 44212899 | Regulira transport mitohondrija |
| | 46737873 | 46834399 | nema gena | | | |
| | 53038694 | 53224856 | TMEM82 | 53065303 | 53068821 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | | | DDI2 | 53131205 | 53133055 | Vezivanje proteina |

*Funkcije gena preuzete s UniProt (<http://www.uniprot.org>) i/ili GeneCards (<http://www.genecards.org>).

Tablica 2. HRR prisutne u više od 25% jedinki i geni prisutni u njima – NASTAVAK

| Chr | Početak regije (bp) | Kraj regije (bp) | Gen | Početak gena (bp) | Kraj gena (bp) | Uloga gena * |
|-----|---------------------|------------------|-----------|-------------------|----------------|--|
| 17 | 23111933 | 23238541 | nema gena | | | |
| | 49059196 | 49199342 | GLT1D1 | 49197829 | 49313590 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| | 58651296 | 58878879 | nema gena | | | |
| 18 | 25743634 | 26469905 | CNGB1 | 25894772 | 25945638 | Aktivnost kationskog kanala |
| | | | TEPP | 25970368 | 25977551 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| 19 | 47263074 | 47485185 | EFCAB3 | 47474735 | 47507698 | Vezivanje kalcijevog iona |
| 20 | 26942991 | 27139796 | nema gena | | | |
| | 40180680 | 41015855 | ADAMTS12 | 39913085 | 40304028 | Vezanje cink iona |
| | | | TARS | 40349625 | 40373064 | Vezanje ATP |
| | 59469483 | 59579936 | nema gena | | | |
| 21 | 29655208 | 29798591 | nema gena | | | |
| | 47747607 | 48148919 | PIWIL1 | 47726941 | 47761637 | Vezanje mRNA i proteinske kinaze |
| | | | FZD10 | 47935477 | 47937432 | Aktivnost receptora za G-protein |
| 22 | 21072799 | 21166727 | nema gena | | | |
| | 49997321 | 50270025 | DOCK3 | 49953523 | 50134786 | Važna uloga u središnjem živčanom sustavu |
| 23 | 479600 | 868795 | KHDRBS2 | 184673 | 864355 | Uključen u vezanje nukleinske kiseline i aktivnost heterodimerizacije proteina |
| | 14099529 | 14380782 | LRFN2 | 14309128 | 14351087 | Kodirajući gen, funkcija nepoznata |
| 24 | 20179970 | 20272221 | nema gena | | | |
| 26 | 38024570 | 38151002 | nema gena | | | |
| 27 | 34643544 | 34808620 | IDO1 | 34686577 | 34699480 | Gen igra važnu ulogu kod odgovora organizma na stres |
| 28 | 19515397 | 19668175 | JMJD1C | 19393375 | 19663523 | Gen je u interakciji s receptorima hormona štitnjače i sudjeluje u vezanju kromatinske DNA |

*Funkcije gena preuzete s UniProt (<http://www.uniprot.org>) i/ili GeneCards (<http://www.genecards.org>).

5 RASPRAVA

Pinzgauer je alpska pasmina dvostruke namjene, za proizvodnju mlijeka i mesa koja je do Drugog svjetskog rata imala važnu ulogu u zemljama Austrougarske monarhije. Nakon Drugog svjetskog rata pasmina gubi važnost i smanjuje im se broj. Fegg (2014.) u svom diplomskom radu putem rodovnika procjenjuje F_{PED} od 4% i efektivnu veličinu populacije od 79 jedinki. Ferenčaković i sur. (2013.) na setu podataka koji se za samo 2 životinje razlikuje od seta koji smo analizirali u ovom istraživanju procjenjuje F_{PED} od 1,9%.

Genetski parametri procijenjeni u ovom radu pokazuju visoku polimorfnost SNP markera od 98,7% dobivenih putem Illumina BovineHD Genotyping BeadChip. Iako za stvaranje ovog SNP čipa nije korištena ova pasmina (http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf), ovako visoka polimorfnost markera odbacuje mogućnost pristranosti ovog alata prema pasminama korištenim u njegovom stvaranju. Najveća vrijednost HET_{OBS} bila je prisutna na kromosomu 27 (0,365), a najniža na kromosomu 2 (0,316) (Tablica 1). Williams i sur. (2014.) u sličnom istraživanju, ali na populaciji koja je izuzetno homozigotna (Chillingham) najveću vrijednost HET_{OBS} bilježe na kromosomu 12, a najnižu na kromosomu 15. Ni kromosomska ni ukupna $HET_{EXP}(0,342)$ kod Pinzgauer goveda ne odstupa od istraživanja na drugim pasminama gdje se nalazila između 0.25–0.34 (prema Williams i sur., 2014.). Procijenjeni koeficijent inbridinga F_{IS} imao je negativan predznak (-0,0133) što upućuje na izostanak uzgoja u srodstvu. Negativan predznak mogao bi značiti i probleme u genotipizaciji, no zbog izvršene kontrole kvalitete i visoke polimorfnosti to ovdje nije slučaj. Ferenčaković i sur. (2013.) koristeći F_{ROH} nalaze niske vrijednosti inbridiga (1,4 – 6,2%) naspram drugih pasmina.

Analiza HRR segmenata rezultirala je s 14126 segmenta. Najveći segment, po duljini koju pokriva na genomu, iznosio je 1016036 bp i nalazio se na kromosomu broj 4, a najkraći je iznosio 36569 bp i nalazio se na kromosomu broj 3. Daljnjom analizom CNV regija utvrđeno je ukupno 184 CNV regije na genomu. Najveći segment bio je na kromosomu broj 11 i iznosio je 4536065 bp dok je najkraći segment bio na 20. kromosomu i iznosio je 1169 bp. Ferenčaković i sur.,(2016.) su u sličnom istraživanju dobili identične rezultate što se tiče HRR-ova kod Pinzgauer goveda, dok CNV regije nisu istraživali, tako da nažalost ne možemo usporediti dobivene rezultate.

Iako su HRR regije dosta male u njima najčešće nalazimo gene. Pronalaskom prividnih regija, odnosno CNV regija i IMD veći od 9.24kb, uspjelo se navedene regije odvojiti od pravih HRR-ova pri čemu je detektirano ukupno 92 regije na 25 kromosoma. Od ukupno detektirane

92 regije, njih 26 nisu sadržavale gene. U regijama je ukupno zabilježen 91 gen. Poznati i opisani funkciju ima 78 gena (Tablica 2.). Proučavajući funkcije tih gena na <http://www.uniprot.org> i <http://www.genecards.org> (posljednji pristup 25.09.2017.) zaključuje se kako pronađeni geni imaju važne funkcije u biološkim procesima. Pronađeno je nekoliko regija koje su izrazito bitne za sami metabolizam jedinke, a koje uključuju gene koji su izravno povezani s bitnim procesima u jedinki kao što su aktivacija GTPaze, vezanje ATP, aktivacija receptora za G protein i kromosomsku replikaciju. Na kromosomu broj 3 imamo regiju u kojoj je mapiran gen *GBP6* koji je izravno uključen u aktivaciju GTPaze i vezivanje GTP, te gen *INSL5* koji je uključen u vezivanje receptora za G protein. Kromosom broj 14 sadrži gen *MCMD2* koji je uključen u spermatogenezu. Nađeno je još niz regija i gena koji utječu na bitne procese unutar organizma, a kao primjer navodim gen *ERM* na kromosomu broj 2 koji kod ljudi ima važnu ulogu u razvoju i strukturi centralnog živčanog sustava. Također navodim gen *ROPNI* na kromosomu broj 1 koji regulira proteinske fosforilacije. Prisutnost gena s velikim utjecajem na važne biološke procese u regijama koje pokazuju visoku heterozigotnost upućuju na mehanizam selekcije u tim regijama (Van Raden i sur., 2011.).

Ovaj rad se nadovezuje na istraživanje Ferenčaković i sur., (2016.) te preciznije nastoji detektirati HRR-ove. Spomenuto istraživanje detektiralo je 11 HRR-ova u 9 kromosoma, dok je ovo istraživanje s preciznijim parametrima i izbacivanjem prividnih regija detektiralo ukupno 92 HRR-ova u 25 kromosoma. Ferenčaković i sur., (2016.) detektirali su ukupno 21 gen što je u usporedbi s našim istraživanjem znatno manje, obzirom da je u ovom istraživanju detektiran ukupno 91 gen u HRR-ovima. Pretpostavka je da geni u ovim regijama povoljno utječu na "fitness" svojstva. Potrebna je daljnja analiza HRR-ova i optimizacija njihove detekcije budući da postoji potencijal HRR pristupa kao jednostavnog alata u detekciji gena koji su odgovorni za "fitness" svojstva, kako kod komercijalnih pasmina tako i kod malih lokalnih pasmina ili divljih vrsta. Svako uspješno detektiranje posebnosti u takvim populacijama može doprinijeti njihovom genetskom očuvanju i boljem razumijevanju genetske arhitekture ugroženih divljih vrsta i kod lokalnih pasmina koje nisu toliko izložene selekciji. Ovo istraživanje, za razliku od prijašnjih istraživanja, preciznije detektira same HRR-ove i zasigurno će biti daljna polazna točka za buduća istraživanja u ovom području.

6 ZAKLJUČCI

1. U genomu Pinzgauer goveda ukupno je nađeno 14126 HRR-ova koje nisu ravnomjerno raspoređene po genomu, već postoje mjesta gdje su učestalije
2. Ukupno je pronađena 91 regija s učestalim HRR segmentima (prisutnim u više od 25% jedinki) na 25 kromosoma
3. U tih 92 regija ukupno je pronađen 91 gen
4. Od 91-og zabilježenog gena, njih 78 ima poznatu i opisanu funkciju
5. Funkcije zabilježenih gena su važne za biološke procese i pojave bolesti te imaju utjecaj na “fitness” jedinke
6. Potrebna je daljnja analiza HRR regija budući da postoji potencijal HRR pristupa kao jednostavnog alata u detekciji gena koji su odgovorni za “fitness” svojstva

7 POPIS LITERATURE

- Alvarez G., Ceballos F.C. & Quinteiro C. (2009). The role of inbreeding in the extinction of a European royal dynasty. *PLoS ONE* **4**, e5174.
- Arcos-Burgos, M. & Muenke, M. (2002). Genetics of population isolates. *Clin Genet* **61**, 233-247.
- Beckmann J.S., Estivill X. & Antonarakis S.E. (2007.). Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 639–646.
- Bjelland D., Weigel K., Vukasinovic N. & Nkrumah J. (2013). Evaluation of inbreeding depression in Holstein cattle using whole-genome SNP markers and alternative measures of genomic inbreeding. *J Dairy Sci* **96**, 4697-706.
- Broman K.W. & Weber J. L. (1999). Long Homozygous Chromosomal Segments in Reference Families from the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain. *Am J Hum Genet* **65**, 1493-500.
- Bruce A. B. (1910). The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science* **32**, 627-628.
- Carothers A. D., Rudan I., Kolcic I., Polasek O., Hayward C., Wright A. F., et al. (2006). Estimating human inbreeding coefficients: comparison of genealogical and marker heterozygosity approaches. *Ann Hum Genet* **70**, 666-676.
- Carter N. (2007.) Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat. Genet* **39**, S16–S21.
- Charlesworth D. & Charlesworth B. (1987). Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annu Rev Ecol Syst* **18**, 237-268.
- Charlesworth B. & Charlesworth D. (1999). The genetic basis of inbreeding depression.
- Charlesworth D. & Willis J. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet* **10**, 783-796.
- Coltman D. & Slate J. (2003). Microsatellite measures of inbreeding: a meta-analysis. *Evolution* **57**, 971-983.

- Crow J.F., (1954). Breeding structure of populations. II. Effective population number. In: Kempthorne O., Bancroft T. A., Gowen J. W., Lush J. L. (Eds.), *Statistics and Mathematics in Biology*, Iowa State University Press, Ames, USA, pp. 543–556.
- Curik I., Ferenčaković M. & Sölkner J. (2014). Inbreeding and runs of homozygosity: A possible solution to an old problem. *Livest Sci* **166**, 26-34.
- Davenport C. B. (1908). Degeneration, albinism, and inbreeding. *Science* **28**, 454-455.
- Drögemüller C., Reichart U., Seuberlich T., Oevermann A., Baumgartner M., KühniBoghenbor K., et al. (2011). An Unusual Splice Defect in the Mitofusin 2 Gene (MFN2) Is Associated with Degenerative Axonopathy in Tyrolean Grey Cattle. *PLoS ONE* **6**, e18931.
- Estivill X. & Armengol L. (2007.). Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet.* **3**, 1787–1799.
- Fegg T. (2014). Modellierung alternativer Zuchtprogramme zur Optimierung des langfristigen Zuchtfortschrittes bei der Rasse Pinzgauer. Master thesis, Universität für Bodenkultur, Wien.
- Ferenčaković M., Banadinović M., Mercvajler., Khayat-Zadeh N., Meszaros G., Cubrik-Curik V., Curik I. & Sölkner J., (2016.). Mapping heterozygosity rich regions in Austrina Pinzgauer cattler. *Acta agriculturae Slovenica*, **5**, 41-4.
- Ferenčaković M., Hamzić E., Gredler B., Solberg T. R., Klemetsdal G., Curik I. & Sölkner J. (2013). Estimates of autozygosity derived from runs of homozygosity: empirical evidence from selected cattle populations. *J Anim Breed Genet* **130**, 286-93.
- Fernandez S. R. Zhang Y. & Parsons C. M. (1995). Dietary formulation with cottonseed meal on a total amino acid versus a digestible amino acid basis. *Poultry Sci*, **74**, 1168-1179.
- Feuk L., Carson A.R. & Scherer S:W (2006.) Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet*, **7**, 85–97.
- Gibson J., Morton N. & Collins A. (2006). Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet* **15**, 789-95.

- Howrigan D.P., Simonson M.A. & Keller M.C., (2011.). Detecting autozygosity through runs of homozygosity: A comparison of three autozygosity detection algorithms. *Genomics BioMed Central*, **12**, 460.
- Iafrate A.J., Feuk L., Rivera M.N., Listewnik M.L., Donahoe P.K., Qi Y., Scherer S.W. & Lee C. (2004.). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* **36**, 949–951.
- Jones D. F. (1917). Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics* **2**, 466-479.
- Keeble F. & Pellew C. (1910). The mode of inheritance of stature and of time of flowering in Peas *Pisum sativum*. *J Genet* **1**, 869-876.
- Keller M. C., Visscher P. M. & Goddard M. E. (2011). Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense single nucleotide polymorphism data. *Genetics* **189**, 237-249.
- Keller M.C., Simonson M.A., Ripke S., Neale B.M., Gejman P.V., Howrigan D.P., Lee S.H., Lencz T., Levinson D.F., Sullivan P.F. & The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, C. (2012). Runs of homozygosity implicate autozygosity as a schizophrenia risk factor. *PLoS Genet* **8**, e1002656.
- Komura D., Shen F., Ishikawa S., Fitch K.R., Chen W., Zhang J., Liu G., Ihara S., Nakamura H., Hurles M.E. & et al. (2006.). Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res.* **16**, 1575–1584.
- Kristensen T. & Sorensen A. (2005). Inbreeding - lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. *Anim Sci* **80**, 121-133.
- Lerner I.M. (1954). Genetic Homeostasis. Oliver and Boyd, London, UK.
- Locke D.P., Sharp A.J., McCarroll S.A., McGrath S.D., Newman T.L., Cheng Z., Schwartz S., Albertson D.G., Pinkel D., Altshuler D.M. & et al. (2006). Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 275–290.
- Malécot G. (1948). Les mathématiques de l'hérédité. Masson, Paris, France.

- McParland L. C., Collinson M. E., Scott A. C. & Campbell G. (2009). The use of reflectance values for the interpretation of natural and anthropogenic charcoal assemblages. *Archaeol Anthropol Sci* **1**, 249-261.
- McQuillan R., Leutenegger A., Abdel-Rahman R., Franklin C., Pericic M., Barac-Lauc L., Smolej-Narancic N., Janicijevic B., Polasek O., Tenesa A., Macleod A., Farrington S., Rudan P., Hayward C., Vitart V., Rudan I., Wild S., Dunlop M., Wright A., Campbell H. & Wilson J. (2008). Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet* **83**, 359-372.
- Peiffer D.A., Le J.M., Steemers F.J., Chang W., Jenniges T., Garcia F., Haden K., Li J., Shaw C.A., Belmont J. & et al. (2006). High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res.* **16**, 1136–1148.
- Pirchner F. (1985). Genetic structure of population. 1. Closed populations or matings among related individuals. In: Chapman, A.B. (Ed.), *General and Quantitative Genetics*, Elsevier, New York, USA, pp. 227–250.
- Pryce J. E., Haile-Mariam M., Goddard M. E. & Hayes B. J. (2014). Identification of genomic regions associated with inbreeding depression in Holstein and Jersey dairy cattle. *Genet Sel Evol* **46**, 71.
- Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R, Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W. & et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. **444**, 444–454.
- Saura M., Fernández A., Varona L., Fernández A. I., de Cara M. Á. R., Barragán C. & Villanueva B. (2015). Detecting inbreeding depression for reproductive traits in Iberian pigs using genome-wide data. *Genet Sel Evol* **47**, 1-9.
- Sebat J., Lakshmi B., Troge J., Alexander J., Young J., Lundin P., Maner S., Massa H., Walker M., Chi M., & et al. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. **305**, 525–528.
- Van Raden P. M., Olson K. M., Null D. J. & Hutchison J. L. (2011). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci* **94**, 6153–6161.

Williams J. L., Hall S. J. G., Del Corvo M., Ballingall K. T., Colli L., Ajmone Marsan P., Biscarini F. (2016). Inbreeding and purging at the genomic Level: the Chillingham cattle reveal extensive, non-random SNP heterozygosity. *Anim Genet* **47**, 19-27.

8 ŽIVOTOPIS

MARIO MERCVAJLER

Rođen sam 21.05.1992. godine u Wangen im Allgäu, Savezna Republika Njemačka. Pohađao sam O.Š. dr. Franjo Tuđman u Šarengradu. Potom upisujem Opću gimnaziju u Iloku, te maturiram 2011. godine. Nakon Opće gimnazije upisujem Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski smjer “Agrarna ekonomika”. Zatim upisujem diplomski smjer “Genetika i oplemenjivanje životinja”. Aktivno se bavim nogometom. Honorarno već 3 godine radim za tvrtku “Synergy sports technology”, te sam aktivan u nekoliko udruga. Prisustvovao sam konferenciji “Snaga hrvatske hrane” u Lisinskom 2015 godine. Sada sam 2. godina diplomskog studija, te pripremam diplomski rad na “Zavodu za opće stočarstvo” pod mentorstvom doc.dr.sc Maje Ferenčaković.